

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos de la josamicina en aurículas aisladas de rata y  
músculos papilares de cobayo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Teresa Tejerina Sanchez**

DIRECTOR:

**Juan Luis Tamargo**

**Madrid, 2015**

TP  
1984  
049

María Teresa Tejerina Sánchez



\* 5 3 0 9 8 6 3 2 4 8 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-154131-1

EFFECTOS DE LA JOSAMICINA EN AURICULAS AISLADAS DE RATA Y MUSCULOS  
PAPILARES DE COBAYO

Departamento de Farmacología  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

**Colección Tesis Doctorales. Nº 49/84**

© **María Teresa Tejerina Sánchez**  
**Edita e imprime la Editorial de la Universidad**  
**Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía**  
**Noviciado, 3 Madrid-8**  
**Madrid, 1984**  
**Xerox 9200 XB 480**  
**Depósito Legal: M-5890-1984**

MARIA TERESA TEJERINA SANCHEZ

"EFECTOS DE LA JOSAMICINA EN AURICULAS AISLADAS DE RATA Y  
MUSCULOS PAPILARES DE COBAYO".

Director: Dr. JUAN TAMARGO MENENDEZ  
Profesor Agregado Numerario

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

1982



DPTO. COORDINADO DE FARMACOLOGIA  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
—  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
Dtor.: PROF. P. D. GARCIA DE JALON

FACULTAD DE MEDICINA  
PABELLON 3  
CIUDAD UNIVERSITARIA  
MADRID-3  
TELEFOS. 243 76 55-449 34 33

JUAN TAMARGO MENENDEZ, PROFESOR AGREGADO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, DE LA UNVIERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título:  
"EFECTOS DE LA JOSAMICINA EN AURICULAS AISLADAS DE RATA Y MUSCULOS PAPILARES DE COBAYO", presentada por la doctoranda M<sup>a</sup> Teresa Tejerina Sanchez, ha sido realizada en este Departamento y bajo mi tutela y dirección.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente en Madrid a treinta de Septiembre de mil novecientos ochenta y dos.



A mis padres,





A Adolfo



### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Tamargo Menendez, Director de esta Tesis Doctoral por su excelente dirección, sus buenos consejos y su amplios conocimientos, sin su ayuda no habría podido ser realizada esta Tesis.

Al Dr. García de Jálón, Director del Departamento Coordinado de Farmacología, de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis en su Departamento, y también por su paternal y cariñoso trato a lo largo de estos años.

A la Dra. Dña. Laura Lastra Santos, por sus valiosos consejos y su amistad.

A los Doctores: Beatriz de Miguel, Santos Barrigón, Carmen Delgado y Javier Manzanares por la ayuda prestada durante la realización de esta Tesis.

A todos los miembros del Departamento Coordinado de Farmacología ya que con su aliento, apoyo y amistad han posibilitado en buena parte la realización de este trabajo.

A Isabel Gomez y Cristina Rivas quienes me ayudaron en múltiples ocasiones.

A Manuel Lorenzo por su gran ayuda técnica y moral.

A M<sup>a</sup> Elena Vicente por su dedicación y excelente mecanografiado.

A todos mi profundo agradecimiento.

## INDICE

JUSTIFICACION DEL TEMA .....	1
1. INTRODUCCION .....	4
1.1. MACROLIDOS: GENERALIDADES .....	5
1.2. ERITROMICINA .....	8
1.2.1. ORIGEN Y CONSTITUCION QUIMICA .....	8
1.2.2. ESPECTRO ANTIMICROBIANO .....	10
1.2.3. MECANISMO DE ACCION .....	13
1.2.4. FARMACOCINETICA .....	14
1.2.4.1. Absorción .....	14
1.2.4.2. Distribución .....	15
1.2.4.3. Excreción .....	17
1.2.5. INDICACIONES .....	18
1.3. OLEANDOMICINA .....	20
1.3.1. FARMACOCINETICA .....	20
1.3.2. INDICACIONES .....	22
1.4. ESPIROMICINA .....	23
1.4.1. ESPECTRO BACTERIANO .....	23
1.4.2. INDICACIONES .....	26
1.5. JOSAMICINA .....	27
1.5.1. ORIGEN Y CONSTITUCION QUIMICA .....	27
1.5.2. FARMACOCINETICA .....	32
1.5.2.1. Absorción .....	32
1.5.2.2. Distribución .....	32

1.5.3.3. Metabolismo y excreción .....	35
1.5.4. INDICACIONES .....	36
1.6. LINCOMICINA Y CLINDAMICINA .....	38
1.6.1. ORIGEN Y ESTRUCTURA QUIMICA .....	38
1.6.2. ESPECTRO ANTIMICROBIANO .....	38
1.6.3. MECANISMO DE ACCION .....	41
1.6.4. FARMACOCINETICA .....	42
1.6.4.1. Absorción .....	42
1.6.4.2. Distribución .....	45
1.6.4.3. Excreción .....	47
1.6.5. INDICACIONES .....	48
1.7. REACCIONES ADVERSAS .....	49
1.7.1. ERITROMICINA .....	49
1.7.2. LINCOMICINA .....	53
1.7.3. ESPIRAMICINA Y OLEANDOMICINA .....	57
1.7.4. JOSAMICINA .....	58
1.8. FASES Y MECANISMOS IONICOS DEL POTENCIAL DE ACCION CARDIACO .....	60
1.8.1. CORRIENTES IONICS CARDIACAS .....	62
A. Respuestas cardiacas rápidas ( $\text{Na}^+$ -de- pendientes) .....	66
B. Respuestas cardiacas lentas ( $\text{Ca}^{++}$ -de- pendientes) .....	71
II. MATERIAL Y METODOS .....	73
1. MATERIAL .....	74

1.1. ANIMALES .....	74
1.2. APARATOS .....	75
1.2.1. COPA .....	75
1.2.2. CAMARA DE LUCITA .....	76
1.2.3. ELECTRODOS Y SISTEMA DE ESTIMULACION ..	76
1.2.4. SISTEMA DE REGISTRO .....	79
2. METODOS .....	80
2.1. AURICULAS DE RATA .....	80
2.1.1. AURICULAS DERECHAS .....	80
2.1.2. AURICULAS IZQUIERDAS .....	81
2.2. MUSCULOS PAPILARES DE COBAYO .....	84
2.2.1. CAPACIDAD DE RESPUESTA DE LA MEMBRANA (MEMBRANE RESPONSIVENESS) .....	85
2.2.2. PERIODO REFRACTARIO EFECTIVO (PRE) Y TIEMPO DE RECUPERACION VENTRICULAR ....	85
2.2.3. AUTOMATISMO Y APARICION DE LENTA DES- POLARIZACION DIASTOLICA .....	86
2.2.4. POTENCIALES DE ACCION $Ca^{++}$ -DEPENDIEN- TES (PA-LENTOS) .....	86
3. FARMACOS UTILIZADOS Y SOLUCIONES .....	86
3.1. FARMACOS UTILIZADOS .....	86
3.2. LIQUIDO NUTRICIO .....	87
4. ESTADISTICA .....	88
III. RESULTADOS .....	89
1. EFECTOS EN AURICULAS AISLADAS DE RATA .....	90



1.1. Efectos sobre la frecuencia cardiaca .....	80
1.2. Efectos sobre la fuerza contráctil en aurícula derecha .....	90
1.3. Efectos sobre la fuerza contráctil en aurícula izquierda .....	96
1.4. Influencia de la Josamicina sobre la relación fuerza-frecuencia en aurícula izquierda.	99
1.5. Efectos sobre el tiempo de recuperación del nodo del seno (TRNS) .....	104
1.6. Efectos sobre el periodo refractario (PR) y frecuencia máxima de estimulación auricular (M.F.E.) .....	109
1.7. Efectos de varios pretratamientos sobre el efecto inotropico negativo de la Josamicina .	112
1.8. Efectos de la Josamicina sobre las respuestas auriculares al Isoproterenol .....	113
1.9. Efecto de la Josamicina sobre la curva dosis-respuesta al Calcio .....	119
1.10. Efecto de la Josamicina sobre las contracciones lentas inducidas en aurículas despolarizadas .....	119
2. EFECTOS EN FIBRAS MUSCULARES VENTRICULARES DE COBAYO .....	128
2.1. Efectos de la Josamicina sobre los potenciales de acción rápidos (PV) ventriculares .	128
2.2. Efectos de la Josamicina sobre los potenciales de acción lentos ventriculares .....	134
IV. DISCUSION .....	141

I. EXPERIMENTOS EN AURICULA AISLADA DE RATA .....	142
II. EFECTOS DE LA JOSAMICINA EN FIBRAS MUSCULARES	
VENTRICULARES (F.M.V.) DE COBAYO .....	147
¿Son los efectos de la Josamicina especie-de-	
pendientes? .....	152
III. POSIBLE REPERCUSION CLINICA DE ESTOS RESUL-	
TADOS .....	153
V. CONCLUSIONES .....	155
VI. BIBLIOGRAFIA .....	160



JUSTIFICACION DEL TEMA

Hace 3 años se introducía en España un nuevo fármaco macrólido, la Josamicina, cuyo espectro y propiedades farmacológicas habían sido recogidas en el Symposium de la Sociedad Japonesa de Microbiología en Tokyó. La Josamicina al igual que otros macrólidos, han sido clásicamente etiquetados de fármacos inocuos, con la excepción de la alteraciones hepáticas descritas con el estolato de Eritromicina. Sin embargo, cuando se revisa los trabajos del antes citado Symposium, nos encontramos con que en diversas especies animales la Josamicina producía "un ligera depresión de la contractilidad y la frecuencia", que no eran cuantificadas, y vasodilatación. Por otro lado, sabemos que dos antibióticos relativamente afines a los macrólidos, Clindamicina y Lincomicina, son capaces cuando se administran a dosis altas por vía intravenosa de producir una depresión cardiorrespiratoria en pacientes, con infecciones estafilocócicas graves.

A la vista de estos resultados pensamos que sería de gran interés que nuestro equipo de trabajo estudiase los efectos cardiológicos de la Josamicina y que estos efectos fuesen comparados con los inducidos por otros 3 antibióticos macrólidos bien conocidos (Eritromicina, Espiramicina y Oleandomicina) así como con los de la Lincomicina y Clindamicina. Esta comparación la realizamos en aurículas aisladas de rata, preparación de fácil manejo, que permite una amplia reproducción de los resultados y con la que hemos trabajado en los últimos 3 años. Han sido todos estos motivos los que nos han impulsado a realizar esta Tesis Doctoral.

Finalmente, y a la vista de que en la aurícula de rata la Josamicina era el fármaco más cardiodepresor de los estudiados, pensamos que sería de interés estudiar, utilizando microelectrodos, sus efectos sobre los potenciales de acción de músculos papilares ventriculares de cobaya. Si bien en esta Tesis no hemos aportado el estudio electrofisiológico de la Josamicina, su realización me ha permitido que me familiarice con las técnicas de registro intracelular que a partir de este momento constituirían mi tarea de trabajo para los próximos años. En suma esta Tesis me ha permitido analizar los efectos cardíacos de la Josamicina y me ha permitido ponerme en contacto con diversas técnicas de Farmacología cardiovascular cuyo conocimiento me ha permitido decidir mi futura tarea de trabajo.

## INTRODUCCION

### MACROLIDOS

#### 1.1.- GENERALIDADES.

Con esta denominación se engloban una serie de antibióticos que presentan una serie de características comunes bien definidas. Estas son (BEDATE, 1980):

1.- Una estructura química similar, formada por un anillo macrocíclico carbonado, cerrado por un enlace lactónico al cual están unidos uno o varios azúcares o aminoazúcares. La supresión de uno de estos azúcares de la molécula nos da compuestos de menos actividad.

2.- Un espectro antibacteriano muy similar al de las Penicilinas, aunque son también activos sobre algunos gérmenes penicilinorresistentes.

3.- Todos ellos inhiben la síntesis protéica bacteriana, fijándose sobre la fracción 50 S de los ribosomas. Este mecanismo común a todos ellos explica el fenómeno de resistencia cruzada.

4.- Poseen buena tolerancia, por lo que las reacciones indeseables son poco frecuentes.

5.- Todos ellos se absorben bien a nivel intestinal, se distribuyen ampliamente por los tejidos y se eliminan en forma activa por vía biliar.

En la Tabla I hemos recogido los principales antibióticos macrólidos, así como los microorganismos de los que fueron



TABLA I

NOMBRE QUIMICO	NOMBRE COMERCIAL	AISSLADO DE	AISSLADO O SINTETIZADO POR
Acumicina		Streptomyces griseoflavus	BICKEL y cols. (1962)
Albomicetina		Streptomyces sp T-12	TAKAHASHI y cols. (1954)
Amaromicina		Streptomyces flavochromogenes	HATA y cols. (1955)
Angolamicina		Streptomyces eurythemus n.sp	CORBAZ y cols. (1955)
Argomicina		Streptomyces griseolus	SHIBATA y cols. (1955)
Chalcomicina	Miconomicin	Streptomyces albogriseolus	GAUMANN y cols. (1962)
		Benedict y cols.	
Cirramicina		Streptomyces sp.N.12090	KOSHIYAMA y cols. (1963)
Eritromicina	Ilotycina	Streptomyces erythreus	MCGUIRE y cols. (1952)
Espiromicina	Foramicidin	Streptomyces ambofaciens	PINNERT-SINDICO y cols. (1954)
	Rovamicin		
Griseomicina	Lomicin	Streptomyces griseleus	VAN DIJCK y cols. (1953)
Josamicina	Josaxin	Streptomyces narbonensis	OSONO y UMEZAWA (1964)
Leucomicina		Streptomyces kitasatoensis	HATA y cols. (1953)
		Hata	
Macrocin		Streptomyces fradiae	HAMILL y STARK (1964)
		M 48 - E 2724	
Magnamicina	Carbomicina	Streptomyces halstedii	TARNER y cols. (1952)
Mesenterina		Nocardia mesenterica	UEDA y UMEZAWA (1955)

TABLA I (Continuación)

NOMBRE QUÍMICO	NOMBRE COMERCIAL	AI SLADO DE,	AI SLADO O SI...TETIZADO POR,
Metimicina		Streptomyces M-2140	DONIN y cols. (1955)
Miamicina		Streptomyces ambofaciens	SCHMITZ y cols. (1957)
Narbomicina		Streptomyces narbonensis	CORBAZ y cols. (1955)
		Cepa Eth 7346	
Neometimicina		Isomero Metimicina	DJERASSI y HALPERN (1957)
Novomicina		Streptomyces niveus	KACZKA y cols. (1955)
		> spheroides	
Oleandomicina	Mateomycina	Streptomyces antibióticus	SOBIN y cols. (1954)
Picromicina		Streptomyces felleus	BROCKMAN y HENKEL (1950)
Proactinomycinas		Nocardia Gardneri	GARDNER y CHAIN (1942)
Rosaramicina		Micrononospora rosaria	REIMAN y cols. (1972)
Tertiomicina		Streptomices sp. 549.AI	OSATO y cols. (1955)
Tylosina		Streptomices fradiae	MCGUIRE y cols. (1961)

inicialmente aislados (KORZYBSKI y cols. 1967; GLASBY, 1976). A continuación pasamos a comentar las principales características farmacológicas de los antibióticos macrólidos utilizados en esta Tesis (Eritromicina, Oleandomicina, Espiromicina y Josamicina), deteniéndonos selectivamente en la Eritromicina, el antibiótico más representativo y mejor conocido de este grupo.

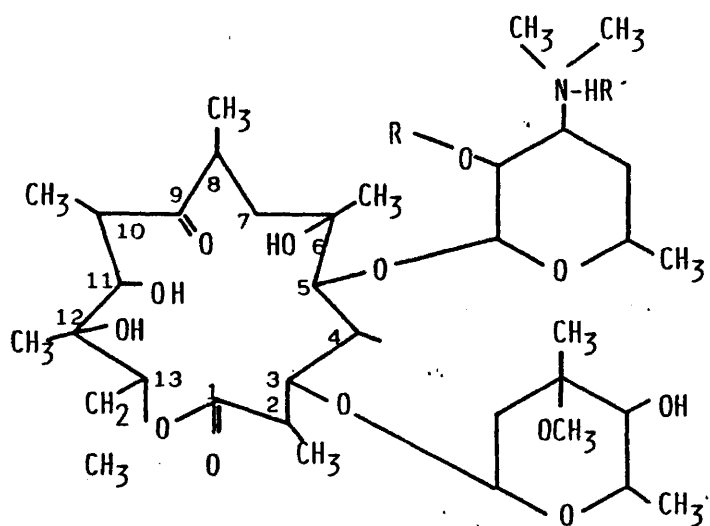
## 1.2.- ERITROMICINA

### 1.2.1.- ORIGEN Y CONSTITUCION QUIMICA.

La Eritromicina es una sustancia blanca o ligeramente amarillenta que se aisló por Lilly Research en 1952 a partir de cultivos del *Streptomyces erythreus* (McGUIRE et al. 1952) obtenidos de muestras de tierra procedentes de Filipinas.

Fisicoquímicamente es una base débil con una constante de disociación de 8.8, poco soluble en  $H_2O$ , pero fácilmente soluble en etanol y disolventes orgánicos y de sabor muy amargo. En estado seco es estable pero una vez disuelta ha de ser mantenida a baja temperatura o pierde su actividad.

La Eritromicina está formada por un macrólido lactónico de 13 átomos de carbono y 1 de oxígeno que recibe el nombre de eritronólido (Figura 1 ). En realidad habría que hablar de 3 Eritromicinas: A, B y C. Las tres tienen en común un aminoazúcar, la desoxamina; la A y la B tienen un segundo azúcar, la cladinosa. La C es semejante a la A pero la cladinosa está sustituida por otro azúcar, la micarosa. Las Eritromicinas B y C



ERITROMICINA

FIGURA 1

poseen menor actividad que la A.

La Eritromicina A es la que se usa, en la clínica y es a la que habitualmente se hace referencia cuando no se indica expresamente lo contrario.

Debido a su sabor amargo y a su inestabilidad en medio ácido gástrico en la práctica se usan diversas sales de Eritromicina. Las sales más utilizadas, así como los nombres farmacéuticos respectivamente se esquematizan en la Tabla II.

#### 1.2.2.- ESPECTRO ANTIMICROBIANO.

El espectro antimicrobiano de la Eritromicina aparece en la Tabla III. Podemos ver que actúa sobre los mismos gérmenes que las penicilinas, aunque presenta mayor actividad sobre los Staphilococos (HASSAM et al., 1978) y sobre algunos cocos gram- (WOOD y col., 1978; OLWICK, 1975). Así es activa frente a ciertas cepas de Staphilococcus penicilinoresistentes, por ejemplo *S. pyogenes* (STEIGBIGEL et al., 1975), frente al Streptococcus faecalis (MARDER y KAYSER, 1977), algunas cepas de Streptococcus viridans y Streptococcus pneumoniae (KISLAK y cols. 1965).

Otros gérmenes gram+ sensibles son el Clostridium tetani y prefringens y el Corynebacterium diphtheriae (ZAMIRI y Mc-ENTEGART, 1972). Dentro de los cocos gram- son sensibles las Neisserias (meningitidis, gonorrhoeae y catarrhalis), la Bordetella pertussis y algunas cepas de Haemophilus influenzae.

Otros gérmenes de interés sensibles a Eritromicina son el Treponema pallidum (BRAUSE et al., 1976) el Mycoplasma pneumo-

TABLA II

	R	R'
ERITROMICINA BASE (Iloticina)	H	
PROPIONATO DE ERITROMICINA	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO	
ESTOLATO DE ERITROMICINA (Isolone)	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> OSO
ESTEARATO DE ERITROMICINA (Pantomicina) (Erythrocin)	H	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> COO
ETILSUCCINATO DE ERITROMICINA (Pantomicina)	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO	
LACTOBIONATO DE ERITROMICINA (Erythrocin IV)	H	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> O <sub>9</sub> COO
GLUCOHEPTANATO DE ERITROMICINA (Ilotycin)	H	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> COO

TABLA III .- ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LA ERITROMICINA

	$\mu\text{g/ml}$		$\mu\text{g/ml}$
S. aureus	0.01-2*	N. gonorrhoeae	0.03-0.5
S. pyogenes	0.03-0.25	N. meningitidis	0.25-2
S. pneumoniae	0.01-0.25	H. influenzae	0.5-8
S. viridans	0.03-4	B. pertussis	0.06-0.25
S. faecalis	0.5-4	Brucella spp.	0.25-32
C. diphtheriae	0.25-4		
C. perfringens	0.25-2		
C. tetani	0.25-0.5		
M. kansasii	0.5-2		
M. scrofulaceum	0.5-16		

\*( $\mu\text{g/ml}$ ) Concentraciones mínimas inhibitorias.

niae (JAO y FINLAND, 1967), muchas cepas de Rickettsias (WISSERMAN et al., 1974), R. prowazekii y Chlamydia (KUO et al., 1977; LEE et al., 1978), algunas Mycobacterium atípicas como el Scrofulaceum, el Kansasii ó el agente productor de la enfermedad del legionario.

#### 1.2.3.- MECANISMO DE ACCION.

La Eritromicina actua como bacteriostático a las dosis habitualmente utilizadas en clínica. A dosis más elevadas puede comportarse también como bactericida, aunque esta posibilidad depende también de la especie bacteriana (GARROD y WATERWORTH, 1962).

Su acción antimicrobiana se realiza inhibiendo la síntesis protéica bacteriana (GOLDBERG, 1965). La acción de la Eritromicina se realiza sobre los ribosomas 70 S. Más aún, los estudios con(<sup>14</sup>C)-Eritromicina indican que ésta se une exclusivamente a la subunidad 50 S del ribosoma, unión que requiere la presencia de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{K}^+$ . La Eritromicina no inhibe la formación del enlace peptídico sino que inhibe el paso subsiguiente, la translocación (CUNDLIFFE y McQUILLEN; 1967), en el que la peptidil-RNA<sub>t</sub> es transportada desde el lugar A (aceptor) al lugar P (donador ó peptidil) (OLEINICK y CORCORAN, 1969).

La peptidil-RNA<sub>t</sub> inmobilizada en el lugar A bloquearía la elongación de la cadena protéica ya que impediría la fijación de un nuevo aminoacil-RNA<sub>t</sub>, y el resultado sería la supresión de la síntesis protéica.



Experimentos más recientes, sin embargo, muestran que la acción de la Eritromicina puede ser más ingeniosa que todo esto. Mientras que la Eritromicina inhibe la reacción de la puromicina con peptidil-RNA<sub>t</sub> natural, se ha observado que no bloquea la reacción cuando se utilizan análogos de peptidil-RNA, tales como el N-acetilfenilalanil-RNA<sub>t</sub> ó el N-acetildifenilalanil-RNA<sub>t</sub>, que tienen mayor afinidad por la peptidil-transferasa que la peptidil-RNA<sub>t</sub> natural. Esto sugiere que la Eritromicina impide que peptidil-RNA<sub>t</sub> gane el adecuado acceso al sitio donador durante la translocación, pero que en cambio parece permitir a la molécula unirse a un lugar contiguo. Solo aquellas especies de peptidil-RNA<sub>t</sub> que posean una afinidad mayor de lo normal por la peptidil-transferasa podrían participar en la formación de un enlace peptídico en esta posición anómala (FRANKLIN y SNOW, 1975). Este mecanismo explica porque la actividad antimicrobiana de los macrólidos sea más intensa en la fase de crecimiento logarítmico del cultivo bacteriano, mientras que en cultivos en fase estacionaria sus efectos son mínimos.

#### 1.2.4.- FARMACOCINETICA.

##### 1.2.4.1. Absorción.

La gran inestabilidad de la Eritromicina, que es destruida por el jugo gástrico, justifica la administración de diversas sales que presentan marcadas diferencias en el grado de absorción tras su administración por vía oral. La absorción oral depende de la dosis utilizada y de la presencia o no de alimentos

en el tracto digestivo, ya que su presencia demora la absorción de la Eritromicina (KNOTHE y cols., 1977).

La Eritromicina base se absorbe bien en la parte superior del intestino delgado, pero por ser inactivada por el jugo gástrico debe administrarse en tabletas con cubierta entérica que se disuelven en duodeno.

El estearato de Eritromicina es resistente al jugo gástrico y se hidroliza en el intestino liberando Eritromicina base que se absorbe. El estolato, es también resistente al medio ácido gástrico y se absorbe por vía digestiva en forma de ester del ácido propiónico (TRIGGS y ASHLEY, 1978). La Eritromicina también se absorbe por vía intestinal en gran parte en forma de ester de etilsuccinato de Eritromicina. Estos ésteres no adquieren actividad antimicrobiana hasta que han sido hidrolizados en el suero (TAZDREW y cols., 1969). Por vía parenteral se utilizan el glucoheptanato y el lactobionato de Eritromicina. Los niveles plasmáticos de las distintas sales de Eritromicina se representan en la Tabla IV .

#### 1.2.4.2. Distribución.

La Eritromicina circula en los líquidos plasmáticos unida a una alfa-globulina. La Eritromicina base se une a proteínas plasmáticas en un 73% y el propianato en un 93%. Se distribuye por todos los tejidos, excepto cerebro y L.C.R. siendo de los pocos antibióticos que penetran en líquido prostático. En condiciones normales atraviesa en pequeñas concentraciones la B.H.E.,

FORMA FARMACEUTICA	VIA	DOSIS (mg)	T <sub>max</sub> (H)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> (H)
BASE	ORAL	250 500 1000	3-4 2-4 4	0.25-0.5 0.9 -1.4 1.3 -1.5	2-4
ESTEARATO en ayunas	ORAL	250 500	2 2-4	1.3 0.4 -1.8	
postprandial	ORAL	500	2-4	0.1 -0.4	2-4
PROPIANATO en ayunas	ORAL	500	2-4	0.4 -1.9	3-5
postprandial	ORAL	500	4	0.3 -0.5	3-4
ESTOLATO en ayunas	ORAL	250 500	2-4 1-2	0.36-3.0 1.4 -5.0	2-4
postprandial		250 500	2-4	1.1 -2.9 1.8 -5.2	
LACTOBIONATO	I.V.	500	0	11.5 -30.0	1-2
GLUCOHEPTANATO	I.V.	250	0	3.5 -10.7	

TABLA IV.- Niveles plasmáticos, dosis y vías de administración de las diversas sales de Eritromicina.

aunque el paso es mayor cuando las meninges están inflamadas (GRIFFITH y BLACK, 1970). Se acumula en hígado y bazo, alcanzando en el hígado concentraciones hasta 13 veces superiores a los niveles plasmáticos. También alcanza altas concentraciones en líquido ascítico y aspirado bronquial. La Eritromicina atraviesa la barrera placentaria, habiéndose demostrado su presencia en líquido amniótico y en sangre fetal; en el feto la Eritromicina se acumula fundamentalmente en hígado y en bazo. Si bien no se ha demostrado que la Eritromicina produzca malformaciones fetales, estos datos unidos al hallazgo de que en la embarazada se alcanzan concentraciones plasmáticas superiores que en la mujer no embarazada, parecen sugerir un especial cuidado en la administración del antibiótico en la mujer gestante (SOUTH y cols. 1964; PHILIPSON y cols. 1973).

#### 1.2.4.3. Excreción.

Solo un 2-5% de la Eritromicina administrada por vía oral se excreta en forma activa por la orina; un 12-15% después de una infusión intravenosa. Por vía renal la Eritromicina se excreta principalmente por filtración glomerular. Sin embargo, la principal vía de eliminación de la Eritromicina la constituyen las heces. Cuando se administran por vía oral dosis elevadas de Eritromicina las heces pueden contener hasta 0.5 mg/g. El antibiótico se concentra en el hígado y se excreta en forma activa por la bilis, que puede contener hasta 250 mg/ml cuando las concentraciones plasmáticas son muy altas. Parte de la Eritro-

micina puede sufrir una demetilación hepática antes de excretarse por bilis (MAO y TARDREW, 1965). La vida media plasmática de la Eritromicina es de 1.4 horas aproximadamente. Esta vida media se prolonga en pacientes con anuria (KUNNIN, 1967). La Eritromicina no se elimina por diálisis peritoneal ni por hemodiálisis.

Otra vía de eliminación la constituye la leche donde la Eritromicina alcanza concentraciones similares a las plasmáticas.

#### 1.2.5.- INDICACIONES.

1. Infecciones por *Stafilococos*. Dada la ineficacia de la penicilina frente a la mayoría de las infecciones estafilocócicas (faringitis, infecciones cutáneas incluidas las heridas, infecciones del tracto urinario), la Eritromicina ha sido el fármaco de elección en su tratamiento (SHOEMAKER y YOW, 1954). En la actualidad es también el fármaco de elección en el tratamiento de procesos infecciosos sensibles a Penicilinas en pacientes que presentan hipersensibilidad alérgica a las mismas.

2. Infecciones por *Streptococos*. Está plenamente demostrada su eficacia incluso frente a *Streptococos* beta-hemolíticos, siendo el fármaco de elección en los cuadros de resistencia ó de hipersensibilidad a las Penicilinas (BREESE et al. 1974).

3. Las infecciones por *Neumococos* suelen responder muy bien al tratamiento con Eritromicina. En la Meningitis por Neu-

mococos, y debido a la dificultad con que atraviesa la B.H.E. se utilizará a altas dosis (4 ó 6 g/d), aunque los resultados son inferiores a los conseguidos con Penicilina ó Cloranfenicol.

4. Es el fármaco de elección en el tratamiento de las infecciones por *Corynebacterium diphtheriae* (GINSBURG y EICHENWALD, 1976; MILLER y cols., 1974) así como en el tratamiento de portadores sanos.

5. En las infecciones por *Clostridium* la respuesta a Eritromicina es muy variable. En las infecciones por *Clostridium Tetani* la respuesta es altamente positiva, siendo el antibiótico más eficaz frente a esta especie.

6. Frente a *Bordetella pertusi* su eficacia es indudable, aunque si la enfermedad ha alcanzado el estado paroxístico ésta sigue su evolución, pero el enfermo deja de ser contagioso (NELSON, 1969; LEADING, ARTICLE, 1970).

7. Otras infecciones. La Eritromicina es activa frente a infecciones producidas por *Haemophiluss*, *Mycoplasma pneumoniae* (FOY et al., 1970; SHAMES et al., 1970; WENZEL et al., 1976) y Micobacterias atípicas. En el eritrasma producido por *Corynebacterium minutissimum* los resultados son espectaculares (SARKANY et al., 1961; KNOX et al., 1964; KINGERY, 1965; BOWYER y McCOLL, 1966). La Eritromicina es activa también frente a las formas precoces de sífilis cuando no es posible la utilización de Penicilina (MONTGOMERY y KNOX, 1959; SCHROETER et al., 1972).

### 1.3. OLEANDOMICINA.

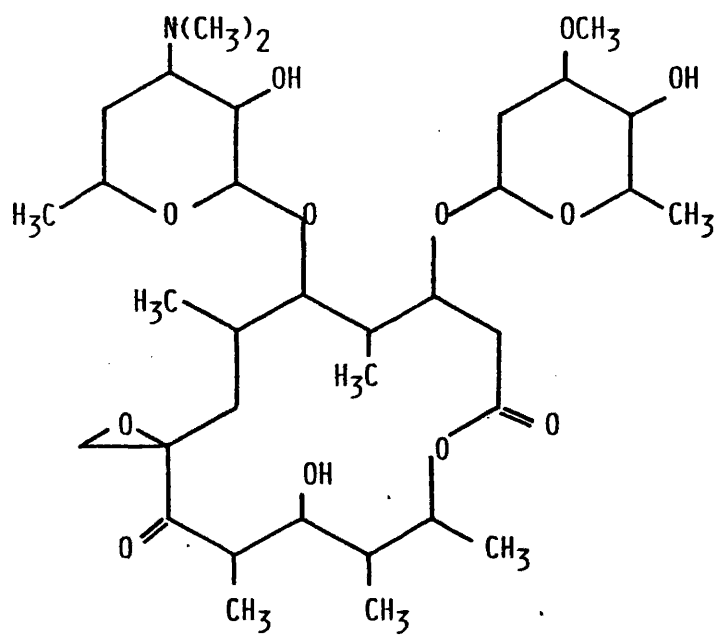
Se obtuvo por los Laboratorios Charles Pfizer & Co. en 1954 a partir de una cepa del *Streptomyces antibioticus*. Posee una estructura química formada por una lactosa saturada (oleandólido) unida a dos azúcares, la desoxamina en C<sub>5</sub> y la oleandrosa en C<sub>3</sub> (Figura 2 ). Como sal soluble se utiliza el fosfato y como éster insoluble, la triacetiloleandomicina (TAO).

En la Tabla V se muestran las preparaciones comerciales, vías de administración y dosis de algunos derivados.

#### 1.3.1. FARMACOCINETICA.

Se absorbe bien en el tracto digestivo. La forma acetilada (triacetil-oleandomicina) es la que mejor se absorbe, alcanzando niveles plasmáticos más elevados que los de la Oleandomicina base ó el fosfato de Oleandomicina. Este último se absorbe completamente por vía intramuscular.

Se distribuye bien por todos los tejidos y líquidos orgánicos; la difusión al L.C.R. aumenta cuando las meninges están inflamadas. Se concentra en bilis, sufre circulación enterohepática y se excreta por heces. Por orina es escasa su excreción, aunque se concentra en riñón alcanzando niveles terapéuticos.



OLEANDOMICINA



cos activos.

#### 1.3.2.- INDICACIONES.

Dado que su espectro antibacteriano y su mecanismo de acción son similares a los de la Eritromicina está indicada en aquellas infecciones producidas por *Estafilococos* resistentes a Penicilinas ó a Eritromicina, si bien debemos de recordar que muchas cepas resistentes a Eritromicina también presentan resistencias cruzadas para los restantes macrólidos.

#### 1.4.- ESPIROMICINA

Fue obtenida en 1954 del *Streptomyces ambofaciens* en los Laboratorios Rhone-Poulenc a partir de muestras de tierra de Paris.

La Espiromicina es una base amorfa que forma con los ácidos sales solubles.

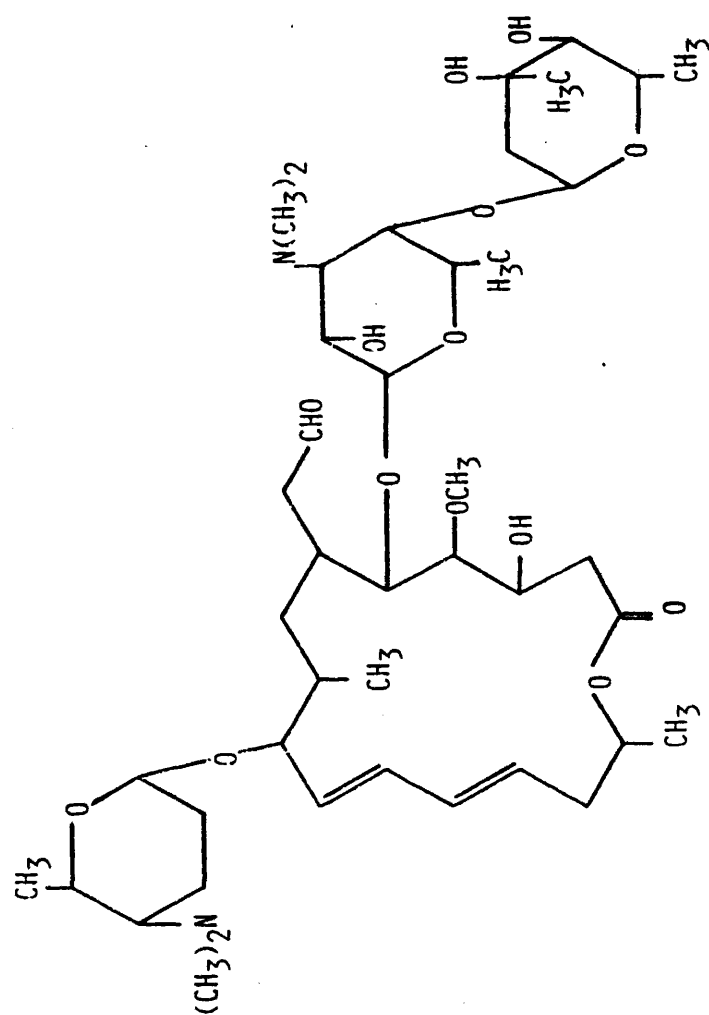
Está constituida por una mezcla de tres componentes: Espiromicina I, II y III, de estructura química muy similar. El anillo lactónico tiene en este caso 19 átomos de carbono y a él se unen dos azúcares aminados, la isomicamina y la micominosa y un azúcar no aminado, la micarosa (Figura 3 ).

En la Tabla V se muestra el preparado comercial, vías de administración, presentación y posología.

Su mecanismo de acción y su farmacocinética son similares a los de Eritromicina. Aunque se ha demostrado que así como la Eritromicina se acumula en próstata y líquido prostático (27  $\mu\text{g/ml}$ ) la Espiromicina se elimina y se acumula selectivamente en saliva (10-12  $\mu\text{g/ml}$ ), por lo que se ha utilizado en el tratamiento de procesos infecciosos orofaríngeos u odontológicos (SUTHERLAND, 1962).

##### 1.4.1.- ESPECTRO BACTERIANO.

La Espiromicina es activa frente a cocos gram + . Es también activa frente a la toxoplasmosis de la embarazada, pero solo sobre las formas vegetativas, no sobre los quistes. Es poco



ESPIRAMICINA

FIGURA 3

FORMA FARMACEUTICA	VIA	DOSIS	POSOLOGIA	
			ADULTOS	NIÑOS
TAO (Cyclamicin)	ORAL	100 125 250	250-500 mg/d	30-50 mg/Kg/d
FOSFATO de OLEANDOMICINA	I.M. I.V.	500 mg 500 mg		
ESPIRAMICINA	ORAL	250 mg	2-5 g/d	50-75 mg/Kg/d

25

TABLA V . PREPARACIONES COMERCIALES, VIAS DE ADMINISTRACION Y DOSIS DE ALGUNOS DERIVADOS DE LA  
OLEANDOMICINA Y ESPIRAMICINA.

activa frente a cocos gram - y Rickettsias (BENAZET y DUBOST, 1959).

#### 1.4. 2.- INDICACIONES.

La Espiromicina si bien es menos activa in vitro que la Eritromicina, presenta la ventaja de una prolongada fijación a los tejidos (parenquima renal, tejido óseo, próstata).

Sus indicaciones son similares a las de la Eritromicina. Puede ser usada como alternativa a la Penicilina G en infecciones producidas por streptococos, neumococos y estafilococos. La Espiromicina se utiliza también en el tratamiento de la gonorrea (DAVID y PORTER, 1959; LEADING ARTICLE, 1970) y en el tratamiento de la toxoplasmosis de la embarazada (BEATTIE, 1967) ya que inhibe la infección por toxoplasmas en el feto (DESMONTS y COUVREUR, 1974). También es activa para el tratamiento de la gonorrea en casos complicados.

## 1.5. JOSAMICINA.

### 1.5.1. ORIGEN Y CONSTITUCION QUIMICA.

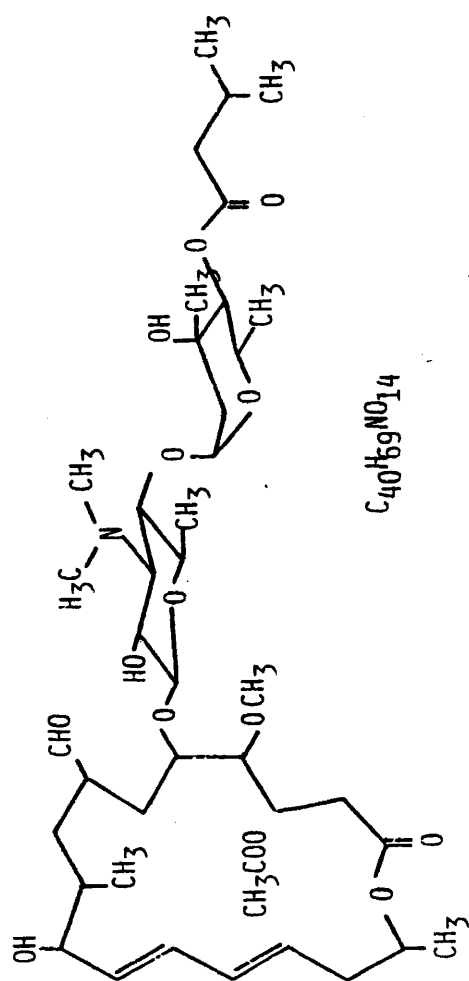
La Josamicina es un nuevo antibiótico macrólido aislado por UMEZAWA y cols. en 1964 a partir de cultivos de *Streptomyces narbonensis*, variedad *josamyceticus*, aislado de muestras de tierra procedente de Motoyama (Japón).

La Josamicina es un polvo blanco o blanco amarillento, inodoro, de sabor amargo, con un punto de fusión de 130°-133°C (OSONO y cols., 1967) y que presenta mayor estabilidad que la Eritromicina en medio ácido. A diferencia de otros macrólidos su acción irritante era prácticamente nula como se demostró al aplicar una solución al 1% en la conjuntiva del conejo durante 7 días (MASAKICHI y cols., 1969). Josamicina es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos, tales como alcohol, ésteres acéticos, cloroformo o benceno y también en agua acidificada, pero es prácticamente insoluble en agua neutra y en éter de petróleo.

La Josamicina base está formada por una molécula de ácido isovalérico unida a dos azúcares, micarosa y micaminosa, así como una lactona macrocíclica (Figura 4). Existe también en forma de propionato que posee similares propiedades físico-químicas que la Josamicina.

### 1.5.2. ESPECTRO ANTIMICROBIANO.

El espectro antibacteriano de la Josamicina se resumió



J O S A M I C I N A

FIGURA 4

en el Symposium que la Sociedad Quimioterapéutica del Japón dedicó a este fármaco en 1968. En resumen, el espectro antimicrobiano de la Josamicina es similar al de la Eritromicina aunque como puede verse en la Tabla VI es un poco más amplio. Muestra una gran actividad antimicrobiana frente a bacterias gram +, micoplasmas y algunos gram - (NAKAZAWA y cols., 1969; OSONO y cols., 1969; MITSUHASHI, 1969) pero su actividad es débil frente a organismos entéricos. In vivo presenta una actividad superior o igual a la de la Eritromicina en infecciones estafilocócicas (OSONO y cols., 1971); presentando sobre la Eritromicina la gran ventaja de no inducir resistencia macrólida en el estafilococo (OSONO y cols., 1971). La mayoría de los estafilococos Eritromicina-resistentes pertenecen al grupo C ó B de la clasificación de MITSUHASHI (1969), en los que la Eritromicina (grupo C) o la Eritromicina y Oleandomicina (grupo B), inducen resistencia macrólida. Josamicina, sin embargo, es efectiva frente a estos estafilococos resistentes, que empiezan a ser muy comunes en nuestro medio. La Josamicina es también efectiva frente a estafilococos resistentes a Tetraciclinas y Penicilinas (OSONO y cols., 1971) por lo que sería de gran utilidad en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas multirresistentes.

Josamicina, así mismo, no presenta resistencia cruzada con otros antibióticos tales como Penicilinas, Estreptomina, Cloranfenicol y Tetraciclinas (GUEVARA SOSA y cols., 1977), pero si muestra resistencia con otros macrólidos.

En general la Josamicina presenta una acción predomi-



TABLA VI . ESPECTRO ANTIMICROBIANO JOSAMICINA.

Estreptococo Beta hemolítico

Estreptococo viridans

Estreptococo Alfa

" albo

" epidermitis

" pyogenos

Estafilococo aureo coagulasa +

Cándida albicans

Diplococcus pneumonia III

Corynebacterium diphtheriae

Bacillus anthracis

" cereus

Clostridium Tetani

" Welchii

" botulinum

Estafilococo resistente a : Estreptomina

Penicilina

Actinomicina

Carbomicina

Erytromicina

Telomicina

Amfomicina

Neisseria gonorrhoeae

" meningiditis

Bordetella pertussis

Aerobacter aerogenas

Klebsiella pneumoniae

Salmonella enteritidis .

Staphylococcus aureus

"            resistentes a : Estreptomicina  
                  Amfomicina  
                  Penicilina  
                  Carbomicina

Haemophilus influenzae

Mycoplasma pneumoniae

Escherichia coli

Shigella

Treponema pallidum.

nantemente bacteriostática aunque se observaban efectos bactericidas a concentraciones superiores a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### 1.5.3. FARMACOCINETICA.

#### 1.5.3.1.- Absorción.

La Josamicina se absorbe bien a nivel intestinal. En ratones, tres horas después de la administración oral de 200 mg/Kg de  $^3\text{H}$ -Josamicina (5.07 mCi/g), el remanente de radioactividad en el contenido del tracto digestivo y heces era de alrededor del 40% de la actividad total original administrada. Tomando en consideración la alta excreción por bilis, puede establecerse que más del 60% de la Josamicina administrada oralmente se absorbía en el intestino en un plazo de 3 horas.

#### 1.5.3.2.- Distribución.

La Josamicina se une menos de un 15% a proteínas plasmáticas. En la Figura 5 se ilustran los niveles hemáticos y tisulares de Josamicina tras su administración oral en ratas (OSONO y cols., 1969).

Una hora después de la administración de  $^3\text{H}$ -Josamicina, la radioactividad alcanzaba concentraciones en el hígado (1.812 dpm/mg) siendo 3 veces más alta a nivel de bilis (6.760 dpm/mg), pero los niveles de actividad eran bajos en sangre y en otros tejidos, con excepción de la alta retención observada en las paredes del estómago e intestino. Tres horas después, la

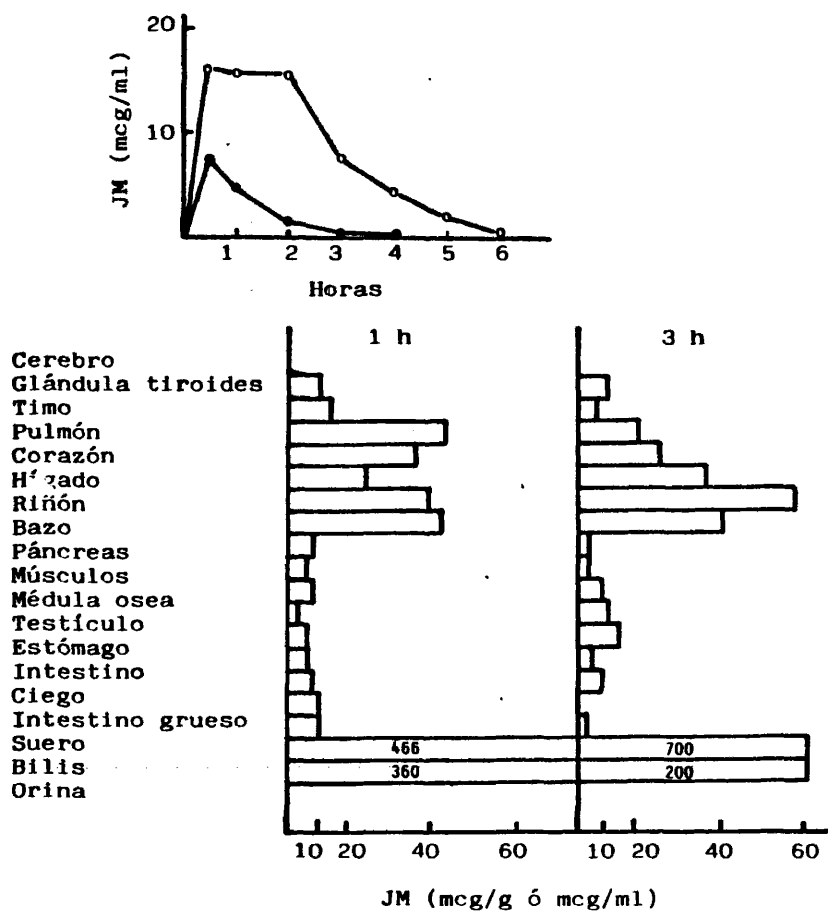


FIGURA 5

concentración en las paredes gastro-intestinales, hígado y bilis,decreció pero la radioactividad alcanzaba altas concentraciones en los pulmones, de hasta 5 veces el nivel en bilis (26.910 dpm/mg); también se observaban niveles más altos en corazón y timo.

Estos resultados muestran las siguientes características de distribución en el organismo del ratón:

- 1) La excreción por bilis encuentra pocas dificultades;
- 2) Después de que la excreción biliar disminuye lentamente, el antibiótico atraviesa el hígado hacia la corriente sanguínea; y
- 3) Posiblemente por una alta afinidad a los tejidos, se fija en grandes cantidades a los pulmones (hasta el 8.47% del fármaco administrado), riñón, bazo e hígado. Estos resultados sugieren también que su excreción se realiza fácilmente por vía renal (más del 25.9% de radioactividad a las 3 horas).

Tras la administración oral de 0.5-1 g de Josamicina base en varones adultos sanos, los niveles plasmáticos máximos oscilaban entre 1.5-1.6  $\mu\text{g/ml}$  y 2.2-3.6  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (OSONO y cols., 1969). Estas concentraciones máximas se alcanzaban a los 30-60 min de su administración y luego descendían progresivamente en las siguientes 6 horas. En el caso del Propionato de Josamicina los niveles plasmáticos máximos se alcanzaban 1-2 h después de la administración.

La Josamicina no atraviesa la barrera hematoencefálica aun cuando exista inflamación meníngea. Sin embargo la Josamicina penetra bien en la leche humana. Los niveles en leche fueron aproximadamente iguales a los niveles en sangre de la madre, des-

pués de la administración oral de 500 mg. Atraviesa placenta encontrándose en sangre umbilical niveles comprendidos entre un 25-50% de los de la sangre materna; los niveles eran aun menores en el líquido amniótico no pudiendo detectarse Josamicina en la sangre periférica de los neonatos (TAKADA y cols., 1969; TOKUDA y cols., 1969). La Josamicina también se distribuye a los tejidos oculares y humor acuoso, pero la aplicación subconjuntival y la instilación en gotas proporciona niveles humorales mucho más altos (MIKUNI y cols., 1969). ITO y cols. (1969) demostraron que la Josamicina también aparece en el esputo; tras la administración de 200 mg de Josamicina en pacientes con bronquiectasias se encontraron hasta 17.4  $\mu\text{g/ml}$  de Josamicina en el esputo recogido 3 horas después.

#### 1.5.3.3. Metabolismo y excreción.

La Josamicina es rápidamente biotransformada en el hígado. En el hombre, se han aislado dos metabolitos de la Josamicina: la 15-hidroxi-Josamicina y la B'-hidroxijosamicina; ambos se encuentran tanto en sangre como en orina. El grupo acetilo de la micaminosa es fácil de hidrolizar enzimáticamente, pero no el OH de la aglicona ó el grupo isovalérico unido a la micarosa.

Otros tejidos, incluyendo pulmón, riñón, músculo e intestino delgado, apenas contribuyen al proceso de biotransformación (MASHIMO y cols., 1969).

La Josamicina se excreta fundamentalmente por vía biliar, pasando al intestino, donde sufre recirculación enterohe-

pática. La excreción renal del antibiótico es poco importante, ya que el fármaco recuperado en orina al cabo de 24 h. representa alrededor del 5% de la dosis administrada. Dado que la Josamicina se excreta principalmente por bilis, su eliminación estará deprimida en pacientes con insuficiencia hepática (OSONO y cols., 1969).

#### 1.5.4. INDICACIONES.

Josamicina está indicada en todo tipo de infecciones causadas por gérmenes sensibles:

1. Infecciones otorrinolaringológicas (faringo-amigdalitis, faringitis, otitis media o rinofaringitis) producidas por *Neumococos*. *Estreptococos* alfa-hemolíticos, *Klebsiellas*, *Neisseria catharralis*, *Estreptococo* epidermitis, *Estreptococo* viridans, *Estreptococo* beta-hemolítico y *Estafilococo aureus* coagulasa positiva. Su eficacia frente a los dos últimos era superior al 90% (VALDEZ y cols., 1977). Idénticos resultados fueron obtenidos por GUEVARA y cols. (1977) en infecciones respiratorias de vías altas.
2. Infecciones respiratorias. La Josamicina dió buenos resultados en infecciones producidas por *Haemophilus*, (Neumonías, abscesos de pulmón, bronquiectasias) (OSONO y cols., 1971).
3. Infecciones biliares por *Estafilococos*, *Estreptococos* hemolíticos y *Neumococo* (OSONO y cols., 1971).

4. Infecciones oftalmológicas (orzuelos producidos por Estafilococos, abscesos, dacrocistitis crónica producida por Neumococos, úlceras corneales producidas por Neumococos y Estafilococos, tenositis aguda producida por Estafilococos, abscesos orbitarios). En totalla terapéutica con Josamicina demostró ser efectiva en el 80% de las enfermedades oculares tratadas, tanto de adultos como de niños (MASAKICHI y cols., 1969):
5. La Josamicina demostró ser eficaz en pacientes con infecciones odontológicas (periodontitis, alveolitis aguda, pulpitis, empiema dental), y en la prevención de infecciones postoperatorias después de la cirugía plástica del hueso alveolar, apicectomia o ablación tumoral (NAGURA y cols., 19 ).
6. Infecciones dermatológicas (forunculosis, piodermitis, superficial y piodermitis secundaria) siendo los resultados más positivos cuanto más precoz era el tratamiento (GOTO y MURAMATO, 1969).



### LINCOSAMIDAS

#### 1.6 LINCOMICINA y CLINDAMICINA

##### 1.6.1. ORIGEN Y ESTRUCTURA QUIMICA. .

La Lincomicina fue aislada en el laboratorio de la compañía Upjohn del *Streptomyces Lincolnensis* variedad *lincolnensis*. (MASON y cols., 1963). Químicamente está constituido por el 4-propilhigrico, un derivado de la pirolidina, y por la metil-tio-lincosamidina unidos por un puente amida (Figura 6 ).

A partir de la Lincomicina fueron preparados numerosos derivados, la mayoría de los cuales tienen menos actividad que la Lincomicina. No fue ese el caso de la Clindamicina (7-cloro-deoxy-Lincomicina) sintetizada por MARGERLEIN y cols. (1967), que es sustancialmente más activa que la Lincomicina.

Las Lincosamidas poseen una estructura distinta a la de los antibióticos macrólidos (Figura 6 ).

##### 1.6.2. ESPECTRO ANTIMICROBIANO.

A pesar de que existen grandes diferencias en cuanto a su constitución las lincosamidas poseen un espectro similar al de los macrólidos (Tabla VII), siendo activas frente a gram+ (*Stafilococos*, *Streptococos* hemolíticos y *Neumococos*). Sin embargo, existen algunas diferencias interesantes con respecto a los macrólidos. Las enterobacterias son resistentes tanto a Lincosa-

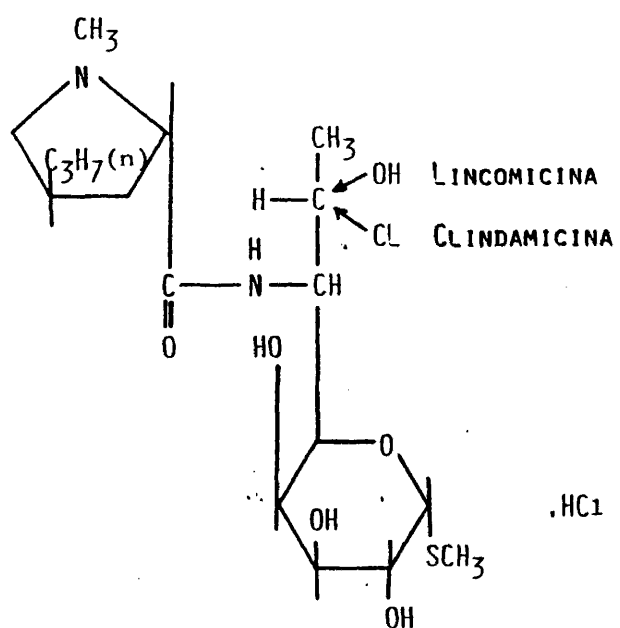


FIGURA 6

TABLA VII.- ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LAS LINCOSAMIDAS

	LINCOMICINA	CLINDAMICINA
<i>S. aureus</i>	0.5-2*	01.-1
<i>S. pyogenes</i>	0.05-1	0.01-0.25
<i>S. pneumoniae</i>	0.1-1	0.05
<i>S. viridans</i>	0.1-1	0.05
<i>S. faecalis</i>	2-64	0.05-64
<i>B. anthracis</i>	0.25-8	
<i>Clostridium</i> spp	0.5-32	
<i>A. israeli</i>	0.1-0.5	
<i>N. gonorrhoeae</i>	8-64	0.5-4
<i>N. meningitidis</i>	32	
<i>H. influenzae</i>	4-16	0.5-16
<i>B. fragilis</i>	2-4	0.02-0.1

\* (ug/ml) Concentración mínima inhibitoria.

midas como a los macrólidos, pero mientras que los *Haemophilus* y *Neisseria* son sensibles a Eritromicina, son resistentes a Lincomicina. Son también activas frente a bacterias anaerobias, siendo el *Clostridium perfringens* más sensible que otras cepas, como el *Clostridium sporogenes* que participa en la gangrena gaseosa y la celulitis anaerobia (WILKINS y THIEL, 1973).

En estudios in vitro la Clindamicina es 4-8 veces más activa que Lincomicina frente a estafilococos y estreptococos (excluido el enterococo) y también frente a stafilococos penicilinasa resistente (McGEHEE y cols., 1968).

#### 1.6.3. MECANISMO DE ACCION.

Actúan sobre la subunidad ribosómica 50 S a la que se unen (CHANG y cols., 1967) e inhiben la síntesis protéica. Esta unión es antagonizada por la Eritromicina y a su vez la propia Lincomicina es capaz de impedir la unión del Cloranfenicol, lo que indica que los lugares de unión de estos tres antibióticos a nivel de la subunidad 50 S están de alguna forma relacionados. El mecanismo por el que la Lincomicina inhibe la síntesis protéica, parece ser similar al del Cloranfenicol, actuando en la subunidad 50 S sobre la peptidiltransferasa e inhibiendo el proceso de transpeptidación como consecuencia se bloquea la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos y la transferencia de la cadena polipeptídica al nuevo aminoácido fijado en el sitio A. La Lincomicina se fija selectivamente en los ribosomas de distintas bacterias, pero no en los ribosomas de los protozoos

y células de organismos superiores (PUMAROLA, 1980). Además, parece que al igual que el Cloranfenicol podría interferir con la unión al ribosoma del terminal aminoacil del aminoacil-RNA<sub>t</sub>, es decir, inhibiendo la iniciación de la cadena (CUNDLIFFE, 1969).

#### 1.6.4. FARMACOCINETICA.

##### 1.6.4.1.- Absorción.

Lincomicina se absorbe bien por vía oral y por vía parenteral. El tiempo necesario para alcanzar la máxima concentración plasmática y el rango de concentraciones plasmáticas máximas así como la vida media del fármaco tras su administración por diversas vías, se representan en la Tabla VIII.

La presencia de alimentos en el estómago retrasa y disminuye significativamente la absorción de las Lincosamidas. La presencia de alimentos disminuye la velocidad de absorción, pero no modifica la biodisponibilidad para la Clindamicina, mientras que en el caso de la Lincomicina la presencia de alimentos modifica, disminuyendo, ambos parámetros, la velocidad de absorción y la biodisponibilidad del fármaco (Figura 7 ).

El palmitato de Clindamicina es inactivo in vitro pero es rápidamente hidrolizado en el intestino antes de que su absorción tenga lugar. Por lo contrario el fosfato de Clindamicina se hidroliza lentamente después de ser inyectado por vía intramuscular.

La Clindamicina se une a proteínas plasmáticas en un 94% mientras que la Lincomicina, que es 50 veces menos liposolu-

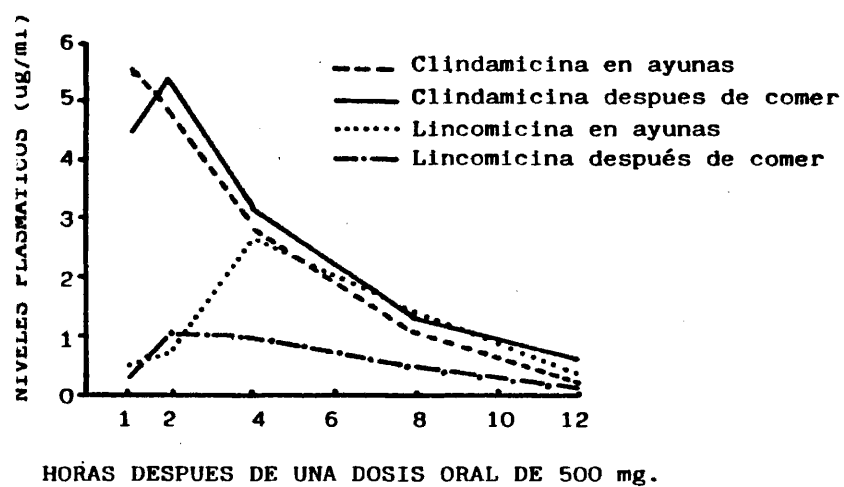


FIGURA 7

Efecto de los alimentos en las concentraciones plasmáticas de Lincomicina y Clindamicina después de la administración oral de los mismos (REDRAWN después McGEHEE et al. 1968).

FARMACO	VIA	DOSIS(mg)	T <sub>max</sub> (H)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	t <sub>1/2</sub> (H)
CLORHIDRATO DE LINCOMICINA	ORAL	500	4	2-7	4-6
		250, 6h.			
		500, 6h.			
	I.M.	200		3.5-4.2	
		600	1-2	8.0-18.0	4-6
	I.V.	300	0	8.0-22.0	3.5-5

TABLA VIII.- Concentraciones plasmáticas máximas del Clorhidrato de Lincomicina administrado por distintas vías en el humano.

ble, solo lo hace en un 75% (PICARDI y cols., 1975).

Las concentraciones máximas en plasma obtenidas tras la administración de diversas sales de Clindamicina aparecen en la Tabla IX .

#### 1.6.4.2. Distribución.

Lincomicina se distribuye por todo el organismo, aunque no se concentra en ningún órgano en especial. Después de hidrolizarse en el suero, el fosfato de Clindamicina sufre rápidamente el proceso de distribución por lo menos en 4 estados diferentes: fosfato, Clindamicina base, demetil derivado y como sulfóxido. El demetil derivado es más activo que la Clindamicina base mientras que el sulfóxido es menos activo.

Todos ellos atraviesan mal la barrera hematoencefálica por lo que los niveles obtenidos en líquido cefalorraquídeo son pobres y erráticos. Sin embargo, pasan la barrera placentaria y aparecen en líquido amniótico.

Las Lincosamidas tienen una gran apetencia por el tejido óseo, tanto en circunstancias fisiológicas como patológicas, depositándose un 37% de la dosis en el tejido óseo cuando se utilizan dosis terapéuticas; la capacidad de penetración en los tejidos blandos inflamados es el doble que en el tejido óseo. En el hueso las Lincosamidas no sufren biotransformación, por tanto se mantiene intacta su actividad antibacteriana (PELZL, Von y cols., 1970), lo que representa una ventaja sobre las Tetraciclinas.



FARMACO	VIA	DOSIS(mg)	T <sub>max</sub> (H)	C <sub>max</sub> (µg/ml)
Clorhidrato de Clindamicina	ORAL	300		3.6
Palmitato de Clindamicina	ORAL I.M.	300	1	1.4-4.2
Fosfato de Clindamicina	I.M.	300	4	3.8
	I.V.	300	0	4.3-6.6
		600		7.9-8.7

TABLA IX .- Concentraciones plasmáticas máximas tras la administración por distintas vías de diversas sales de Clindamicina en el humano.

#### 1.6.4.3. Excreción.

La excreción renal de Lincomicina es pequeña excepto tras su administración por vía i.v. Así, al cabo de 24 h de su administración por vía oral, solo un 3,5% de la dosis administrada aparece en la orina, mientras que tras su administración i.v. aparece hasta un 60% y este porcentaje aumenta considerablemente después de dosis múltiples. En insuficientes renales con tratamiento por diálisis, no se alteran los niveles plasmáticos con Lincomicina por no ser ésta dializable. Menos del 10% del fosfato de Clindamicina es excretado inalterado por orina. Esta excreción aparece en la orina durante 4 días, lo que sugiere que el fármaco se libera lentamente desde los tejidos. En pacientes con alteraciones renales graves, los niveles plasmáticos de Clindamicina son 3-4 veces superiores a los normales y estas altas concentraciones persisten por más de 24 horas. La hemodialisis no modifica los niveles plasmáticos de Clindamicina ya que al igual que la Lincomicina no es dializable.

El hígado juega un papel importante en la eliminación de Lincomicina y del fosfato de Clindamicina, observándose que ésta se convierte en Clindamicina base más lentamente en pacientes con función hepática deteriorada. Después de 2 horas de una infusión intravenosa de Clindamicina la bilis contiene grandes concentraciones (67  $\mu\text{g/ml}$ ) de Clindamicina y de un derivado demetilado. En pacientes con cirrosis hepática la vida media plasmática aumenta unos 60 minutos sobre los valores normales.

#### 1.6.5. INDICACIONES.

Las Lincosamidas son activas contra muchos cocos gram + (incluidos Neumococos, Estreptococos del grupo A y Estafilococos).

Han sido utilizadas en el tratamiento de faringitis estreptocócica y en otitis producidas por gram +. Resultados satisfactorios han sido también obtenidos en el tratamiento de neumonías y piodermitis, tanto en niños como en adultos. La Clindamicina es efectiva en el tratamiento del acné, siendo para algunos autores el fármaco de elección (DANTZIG, 1976).

Las Lincosamidas son muy efectivas en el tratamiento de infecciones graves incluídas difteria y septicemia estafilocócica. Dada su buena penetración en el hueso, están particularmente indicadas en el tratamiento de osteomielitis por estafilococos (GEDDES et al., 1977; PELZL von H., 1970).

Por su espectro antimicrobiano y su baja toxicidad, la Clindamicina puede sustituir en el tratamiento de infecciones por cocos gram + a la Penicilina cuando ésta está contraindicada.

Clindamicina es también muy efectiva en la profilaxis y tratamiento de infecciones anaeróbicas, estando indicada en el tratamiento por anaerobios del tracto genito-urinario femenino (BARTLETT y col., 1972; FASS y cols., 1973).

## 1.7. REACCIONES ADVERSAS

### 1.7.1. ERITROMICINA.

Los estudios realizados tanto en animales de experimentación como en el hombre indican que la Eritromicina es una sustancia poco tóxica (GARROD, 1973; BEDATE, 1980). Sin embargo, no es tan inocua como en un principio se pensó. En pruebas de toxicidad aguda, se observa una gran variabilidad en los efectos indeseables según la especie animal estudiada. En animales muy sensibles (cobayas y hamster) a la Eritromicina no es posible demostrar con certeza la causa de su muerte y en los animales que sobrevivían las alteraciones desaparecían pasados unos días de la interrupción del tratamiento, de lo que se deduce que los efectos de la Eritromicina desaparecían muy rápidamente al cesar su administración.

Los efectos indeseables más comunes tras la administración de Eritromicina los agrupamos en 4 apartados:

#### 1) Alteraciones del aparato gastro-intestinal.

1.1. Irritación del tracto digestivo que ocasiona náuseas, vómitos y más raramente diarreas de tipo disenteriforme. Las diarreas aparecen mas frecuentemente tras la administración del estolato (JACKSON y SAUNDERS, 1973).

1.2. A nivel hepático la reacción más importante es la aparición súbita de una ictericia de tipo colostática (MASEL, 1962;

SHERLOCK, 1968), raramente se observan alteraciones orgánicas hepáticas, que cursan con un aumento de transaminasas asemejando el cuadro al de una hepatitis vírica.

El esteolato de Eritromicina produce alteraciones hepáticas, que cursan con dolor abdominal, fiebre, aumento del tamaño del hígado, aumento en la bilirrubinemia, con ó sin ictericia, orina oscura y eoxinofilia (OLIVER y cols., 1973). Raramente y después de 10-20 días de iniciar el tratamiento pueden aparecer: hepatitis, que asemeja a una hepatitis de tipo vírica, colecistitis, pancreatitis o cuadros que asemejan a un infarto de miocardio. Los cuadros no eran mortales y tan pronto como se suprimía el fármaco la recuperación de los pacientes era total (BRAUM, 1969).

Después que los pacientes se han recuperado, los síntomas pueden reaparecer si administramos esteolato de Eritromicina (COOKSLEY y POWELL, 1977), pero no si administramos Eritromicina base o Estearato. Los estudios de TOLMAN y cols. (1974) en voluntarios, establecieron que la fracción molecular responsable de estas reacciones era el enlace propinil-éster. La relativa frecuencia y rapidez (horas) (ROBINSON, 1961; GILBERT, 1962; BRAUM, 1969) con que aparecen estas reacciones después de una segunda administración, sugiere que la reacción resulta de una mezcla de colestasis intrahepático, necrosis de la célula hepática e hipersensibilidad (McKENZIE y DOYLE, 1966), ya que el cuadro cursa también con eoxinofilia. CLAKE y cols. (1975) demostraron

que la interacción directa entre Eritromicina y sales biliares podría ser la responsable de la ictericia colostática. ZIMMERMAN y cols. (1974) demostraron que el esteolato de Eritromicina es 100 veces más tóxico en células hepáticas aisladas que lo es el propionato o la Eritromicina base.

En pacientes que reciben esteolato de Eritromicina suele existir un incremento de SGOT y los niveles de  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa eran anormales; la aparición de valores anormales de SGOT debe ser interpretada con precaución ya que se ha demostrado que algunos metabolitos del esteolato interfieren con las técnicas de medida usadas comunmente, originando falsos positivos (SABATH y cols., 1978).

Aproximadamente el 10% de las mujeres gestantes que en la segunda mitad del embarazo presentaban infecciones por Mycoplasma genital y fueron tratadas durante 6 semanas con esteolato de Eritromicina, desarrollaban un aumento en los niveles de SGOT, los cuales volvieron a sus niveles normales después de suspender el tratamiento (McCORMACK y cols., 1977).

## 2) Reacciones de hipersensibilidad.

Se han demostrado la aparición de fiebre, eoxinopenia y erupciones cutáneas en general poco importantes tras la administración de Eritromicina. Gran parte de estas manifestaciones indeseables aparecen tras el empleo del estolato de Eritromicina, lo que hace pensar que es el componente inerte lo que confie-

re toxicidad a la molécula.

3) Las alteraciones del aparato auditivo son señaladas por todos los autores, aunque su aparición es rara, aparecen fundamentalmente cuando se administra lactobionato de Eritromicina tanto en administración intravenosa (MINTZ et al., 1973; QUINNAN y McCABE, 1978), como administración oral (ECKMAN et al., 1975; VAN MARION et al., 1978).

4) Reacciones de superinfección.

Producidas por gérmenes gram negativos, hongos o levaduras (por ejemplo vaginitis por candida Albicans) pueden aparecer durante el tratamiento con Eritromicina. Estas reacciones son mas frecuentes en medio hospitalario, siendo su incidencia muy inferior a la observada con las Tetraciclinas.

### 1.7.2. LINCOSAMIDAS.

Varias son las reacciones adversas de las Lincosamidas.

#### 1) Alteraciones del aparato gastro-intestinal

1.1. Irritación del tracto digestivo que origina nauseas, vómitos, calambres abdominales y diarreas. Esta diarrea afecta al 10% de los pacientes, pero algunas veces es severa (KAPLAN y WEISTEIN, 1968) y puede llegar a ser fatal, la diarrea frecuentemente es sangrante y cursa con dolor abdominal difuso, distensión, tenesmo y fiebre (LEFROCK y cols., 1975). La diarrea es mas frecuente en pacientes con edad avanzada y tras la administración de Lincosamidas por via oral (TEDESCO y cols., 1974; KABINS y cols., 1975) pero no está relacionada con la duración del tratamiento o con la dosis administrada.

Tras la administración intravenosa de Clindamicina los pacientes dicen tener un sabor metálico en la boca. La ingesta prolongada de capsulas de Clindamicina produce ulceras en la porción inferior del esófago.

1.2. Colitis pseudomembranosa: KAPLAN y WEINSTEIN (1968) observaron que la Lincomicina producía diarreas que ocasionalmente podían ser muy severas. A su vez las Lincosamidas producen colitis ulcerosa aguda que puede persistir, una o dos semanas, después de haber suprimido el tratamiento. Poste-



riormente numerosos autores han reportado la aparición de colitis pseudomembranosa tras la administración oral o parenteral de Lincomicina (BENNER y TELLMAN, 1970; SCOTT et al., 1973; SCOTT y NICHOLSON, 1974; LEADING ARTICLE, 1974; Le FROCK et al., 1975; GIBSON et al., 1975; CLARK et al., 1976, MUNK et al., 1976).

Tras la administración de Clindamicina, tanto por vía oral como parenteral, aparece diarrea grave y colitis pseudomembranosa (COHEN et al., 1973; WELLS et al., 1974; LEADING ARTICLE, 1974; TEDESCO et al., 1974, Le FROCK et al., 1975; KEUSCH y PRESENT, 1976; LEMON et al., 1976; FRIEDMAN et al., 1976; ROBERTSON et al., 1977; SWARTZBERG et al., 1977; GURWITH et al., 1977, LUSK et al., 1977, NEU et al., 1977).

La diarrea acuosa, sanguinolenta, cursa sin fiebre con leucocitosis, dolor abdominal y cambios radiológicos que evidencian una ulceración mucosa importante con pseudomembranas y pseudopolipos (BURCH y cols., 1976; VITERI y cols. 1974).

Las pseudomembranas están compuestas de leucocitos polimorfos nucleares, fibrinas y células necróticas. La colitis pseudomembranosa se cree que está producida por la toxina del *Clostridium difficile* (BARTLETT et al., 1978; BURDON y GEORGE, 1978; GEORGE et al., 1978a y b). El mecanismo de acción todavía no es bien conocido, si bien se ha postulado que *Clostridium difficile* aislados de humano podían

producir un potente agente inflamatorio el P-cresol (LARSON et al., 1978). En condiciones normales el crecimiento del *Clostridium difficile* está limitado por otras bacterias, y la producción de P-cresol no es importante tras la administración de ciertos antibióticos: Lincomicina, etc. El *Clostridium difficile* aumenta extraordinariamente la producción de la toxina (LARSON et al., 1978; GEORGE, 1978).

- 1.3. Hepatotoxicidad: No hay acuerdo entre los diversos autores sobre los efectos de las Lincosamidas a nivel hepático. La administración intramuscular o intravenosa de fosfato de Clindamicina puede causar elevación de la SGOT y SGPT (FASS y cols., 1972) y de la fosfatasa alcalina sérica, pero no hay generalmente hiperbilirrubinemia. Es por ello que no existe una clara relación entre estos cambios y la posible hepatotoxicidad inducida por las Lincosamidas.

## 2) Alteraciones cardiovasculares

En algunos pacientes que recibieron Lincosamidas por vía intravenosa rápida a altas dosis apareció un descenso brusco de la presión sanguínea que se acompañaba de náuseas, vómitos, arritmias y, en pacientes que se les administró  $\approx 12$  g aparecía incluso parada cardíaca. Para unos autores (DAUBECK y cols., 1974) la parada cardíaca sería acción directa del fármaco sobre miocardio, lo que ellos atribuyen al hecho de que las Lincosamidas presentan una semejanza con algunos fármacos antiarrítmicos del grupo I (estabilizadores de membrana). Por el contrario, o-

tros autores (WAISBREN, 1968; O'CONNELL y PLAUT, 1969), dado que la parada cardíaca solo aparecía cuando se administraba por vía intravenosa rápida, postulan que ésta parada sería consecuencia de un efecto de embolada. Esta hipótesis es avalada por que en la administración por vía intravenosa lenta (5-10 min.) no producía ninguna depresión cardio-respiratoria.

3) Alteraciones neuromusculares: La Lincomicina puede producir depresión en la transmisión neuromuscular, pero el efecto es mucho mas débil que con la Neomicina. RUBBO y cols., (1977) demostraron que Lincomicina y Clindamicina bloquean la transmisión neuromuscular por una acción postsináptica. Este bloqueo es transitorio (SAMUELSON y cols., 1975) y no hay efecto acumulativo. Por otro lado la Lincomicina potencia la acción bloqueante neuromuscular del curare, de aquí que pacientes que reciben Lincomicina después de ser anestesiados deben ser observados cuidadosamente ante riesgo de aparición de una depresión respiratoria.

4) Hipersensibilidad: Algunos pacientes, presentan rash, y muy raramente cuadros anafilácticos (LEVISON y cols., 1974).

### 1.7.3. ESPIRAMICINA Y OLEANDOMICINA.

Son antibióticos con pocos efectos indeseables. Efectos gastrointestinales (nauseas, vómitos, diarrea) son frecuentes tras la administración de altas dosis por vía oral. La triacetiloleandomicina produce a nivel hepático efectos semejantes a los del estolato de Eritromicina (TIEKTIN y ZIMMERMAN, 1962). Además la triacetiloleandomicina puede potenciar la acción de la Carbamazepina por interferir con el metabolismo de ésta en el hígado (DRAVET et al., 1977).

Algunos pacientes presentan reacciones alérgicas mínimas (rash, exantema).

#### 1.7.4. JOSAMICINA.

La Josamicina es un fármaco muy poco tóxico. En 32 hospitales japoneses y sobre un total de 785 pacientes tratados la incidencia de los efectos indeseables era de un 3,9%. Los efectos que predominaban eran digestivos (anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, gestralgia) y dermatológicos (rash, prurito). En ratas que recibieron hasta 3000 mg/Kg/día, (HAZATO y cols., 1969), la cantidad máxima técnicamente posible de administrar, no se observaron cambios significativos en conducta, marcha, ingesta de alimentos, crecimiento, peso corporal o en datos hematológicos. Observaciones similares se realizaron en perros tras la administración de 240 mg/Kg durante 4 semanas.

A diferencia de los beta-lactámicos, la Josamicina raramente provoca reacciones alérgicas y cuando estas aparecen son leves y remiten fácilmente (OSONO, 1970). A diferencia de Eritromicina y Oleandomicina, la Josamicina carece de toxicidad hepática, no habiéndose observado a lo largo de 6 meses en animales y durante mas de 1 mes en clínica humana la menor alteración hepática (KURIAKI y cols., 1969). Tampoco estos autores han podido demostrar alteraciones fetales teratogénicas en ratones que habían recibido hasta 3000 mg/Kg/día.

### 1.8. FASES Y MECANISMOS IONICOS DEL POTENCIAL DE ACCION CARDIACO.

El interior de las células cardíacas es electro negativo con respecto al espacio extracelular ( $-40$  a  $-70$  mV ó  $-80$  a  $-90$  mV, según el tipo de célula); a esta diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana se la denomina potencial de reposo y su valor permanece estable en la mayoría de las células hasta que tiene lugar su excitación. Si a una célula cardíaca en reposo se le aplica un impulso despolarizante de suficiente intensidad, el potencial de membrana se desplaza hacia valores cada vez menos negativos, y si se alcanza un determinado valor crítico, denominado potencial umbral, se originará un potencial de acción (PA) propagado (HOFFMAN y cols., 1960). El PA cardíaco se inicia por una fase de rápida despolarización (Fase 0) que desplaza el potencial de membrana hasta valores positivos ( $+25$  ó  $+30$  mV); a la porción de la fase 0 durante la cual el potencial de membrana alcanza valores positivos se la denomina overshoot. Este desplazamiento del potencial de membrana define la amplitud del PA. A continuación tiene lugar la repolarización celular en la que distinguimos 3 fases: una fase inicial de rápida repolarización que ha sido atribuida a la inactivación de la  $i_{Na}$ ; una meseta o fase 2 y una repolarización rápida o fase 3 que lleva de nuevo el potencial de membrana hasta los valores previos a la excitación (Fig. 8). El periodo comprendido entre 2 PA se denomina fase 4 ó potencial diastólico. En fibras ventriculares la fase 0 corresponde a la onda R y las fases 2 y 3 a los espacios ST y T, respectivamente, del electrocardiograma (Fig.8 ).

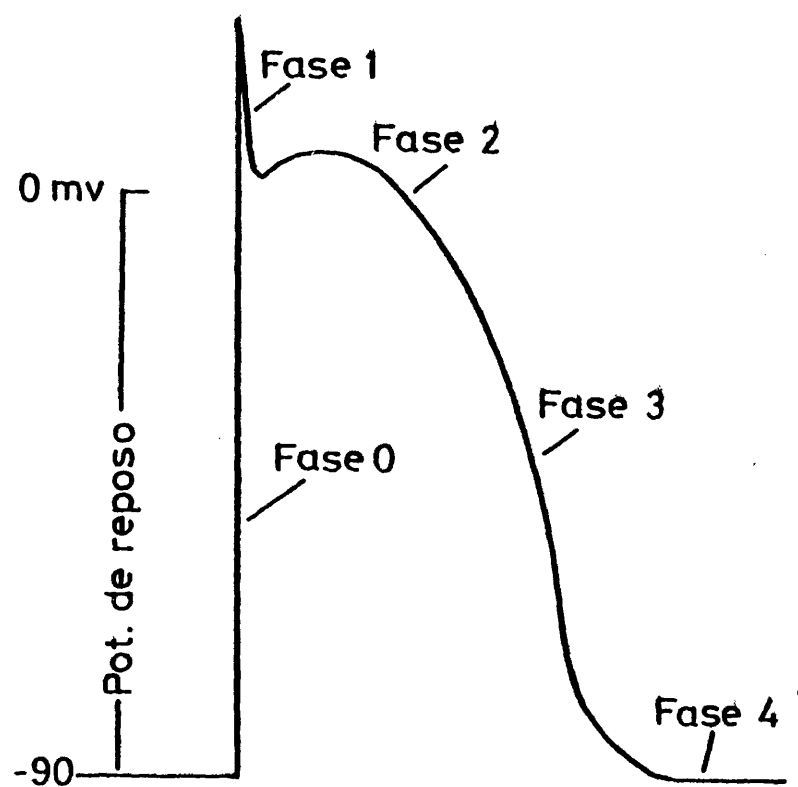


FIGURA 8

### 1.8.1 CORRIENTES IONICAS CARDIACAS

Todas estas fases que acabamos de describir son debidas a una secuencia de cambios en las corrientes iónicas a través de la membrana de las células cardíacas. FOZZARD y GIBBON han señalado la existencia de hasta 8 canales ó pasos iónicos específicos a través de las membranas cardíacas. En la Tabla X se representa la cinética de dichos canales (Activación = ON; Inactivación = OFF) y su papel en las diversas fases del PA.

Como en la mayoría de las células excitables en el miocardio la fase 0 de rápida despolarización diastólica es debida a un aumento específico de la permeabilidad de la membrana para los iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ). Cuando el potencial de membrana alcanza el nivel del potencial umbral la permeabilidad de la membrana al  $\text{Na}^+$  aumenta bruscamente, produciéndose una corriente rápida de entrada de  $\text{Na}^+$  hacia el interior de la célula cardíaca ( $i_{\text{Na}}$ ) que actua como corriente despolarizante. Por tanto, la amplitud y la velocidad máxima de despolarización ( $dv/dt$ ) de la fase 0 del potencial de acción son debidos a la activación de la  $i_{\text{Na}}$ .

Diversos experimentos han demostrado que los  $\text{Na}^+$  son los responsables de la amplitud y de la rápida velocidad de despolarización del PA: a) la  $i_{\text{Na}}$  desaparece en soluciones carentes de  $\text{Na}^+$  ó en las que éste ha sido sustituido por sucrosa o por colina. DRAPER y WEIDMANN (1959) fueron los primeros en demostrar que el pico y la amplitud del PA también variaban siguiendo la  $[\text{Na}]_o$ , comportándose como un electrodo selectivo al sodio. b) el potencial de inversión de la  $i_{\text{Na}}$  sigue la  $[\text{Na}]_o$  según lo predicho por



TABLA X

## CINETICA DE LOS CANALES IONICOS

ION	DIRECCION	CANAL	FASES DEL POTENCIAL DE ACCION					
			F.0	F.1	Mues-ca	F.2	F.3	F.4
Sodio .....	IN	1 iNa (fast)	ON	OFF	---	---	---	---
Sodio .....	IN	2 iNa (slow)	--	---	OK	OFF	---	---
Cloro .....	IN	3 iCl	--	ON	OFF	---	---	---
Calcio .....	IN	4 iCa	--	---	ON	---	OFF	---
Potasio ...	OUT	5 iK <sub>1</sub>	OFF	---	---	---	ON	---
Potasio ...	OUT	6 iX <sub>1</sub>	---	---	---	---	ON	OFF
Potasio ...	OUT	7 iX <sub>2</sub>	---	---	0	0	0	---
Potasio ...	OUT	8 iK <sub>2</sub>	---	---	---	ON	---	OFF

## Canales iónicos:

- 1) iNa fast interviene en la fase 0 (despolarización brusca).
- 2) iNa slow interviene en la fase 2 ó meseta.
- 3) iCl suprime la fase 0 y produce la repolarización fase 1.
- 4) iCa mantiene la fase 2 ó meseta, aumenta APD.
- 5) iK<sub>1</sub> interviene repolarización fase 3.
- 6) iX<sub>1</sub> interviene repolarización fase 3.
- 7) iX<sub>2</sub> determinante automatismo fase 4.
- 8) iK<sub>2</sub> determinante automatismo fase 4.

X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> no son canales puros, además del K<sup>+</sup> intervienen otros iones.

"i" indica las corrientes iónicas de membrana.

la ecuación de Nerst. c) la  $i_{Na}$  bloquease específicamente por la Tetrodotoxina (TTX). Varias toxinas (Batracotoxina, Grayanotoxina, la toxina de la Anemonia sulcata, Veratrina, Germitrina) aumentan la fuerza de contracción en el músculo cardíaco. Este aumento contráctil sería debido al sistema de intercambio  $Na/Ca$  de la membrana, que facilitaría la entrada de  $Ca^{++}$  cuando la concentración de  $(Na^+)_i$  aumenta. Por el contrario, el overshoot y la magnitud de la fase 2 eran relativamente insensibles a la  $(Na)$ , pero dependientes de la  $/Ca/o$ . Ello hizo suponer que el overshoot y la fase 2 del PA serían consecuencia de una corriente de entrada lenta de  $Ca^{++}$  ( $iS_1$ ). ROUGIER (1969) y TARR (1971) pudieron demostrar en la aurícula de rana que en ausencia de  $iS_1$  el overshoot y la fase 2 del PA desaparecían, por lo que después de la fase de rápida despolarización la repolarización comenzaba inmediatamente. Estos resultados sugieren que la  $iS_1$  sería la corriente que mantiene la fase 2 y que la fase 3 de rápida repolarización sería debida a la inactivación del  $iS_1$ . Ello fue corroborado por diversos experimentos: a) la  $iS_1$  desaparece en soluciones carentes de  $Ca^{++}$  y su magnitud aumenta al aumentar la concentración extracelular de  $Ca$ ,  $/Ca/o$ . b) cuando se adiciona  $La^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Ni^{++}$ , D600 y Verapamil al líquido de perfusión no se afecta ni la despolarización rápida, pero si se deprime la magnitud de la fase 2 del PA. Por el contrario la TTX no altera la magnitud de la fase 2. Desgraciadamente ninguno de los bloqueantes de la  $iS_1$  se pueden considerar específicos.  $La^{++}$  y  $Mn^{++}$  además de inhibir la  $iS_1$  reducen la  $iX_2$  y la  $iNa$ . La  $iS_1$  también puede ser deprimida por los inhi-

bidores metabólicos (Dinitrofenol), posiblemente a tenor de un aumento en la  $(Ca^{++})_i$  que reduciría el gradiente químico de este ión. c) la Adrenalina, que aumenta la  $iS_1$ , también aumenta la magnitud de la fase 2; los efectos muscarínicos producen el efecto contrario. Todo ello permite afirmar que la  $iS_1$  sería la responsable del overshoot y de la fase 2 del PA.

¿Qué iones están involucrados en la  $iS_1$ ? En el miocardio ventricular de gato, oveja y de perro, la  $iS_1$  parece ser llevada exclusivamente por  $Ca^{++}$ . Sin embargo, en el miocardio ventricular de cobaya y de rata, la  $iS_1$  sería llevada por  $Na^+$  y  $Ca^{++}$ . De hecho OCHI (1971) demostró la existencia de una  $iS_1$  en músculos papilares de cobaya perfundidos en soluciones carentes de  $Ca^{++}$ . En fibras de Purkinje (FP) la  $iS_1$  también parece ser llevada por  $Na^+$  y  $Ca^{++}$ . De cualquier forma el canal lento es inespecífico; otros iones (Ba, Mg, Se) pueden penetrar al interior celular a su través. El que no dependa exclusivamente de los iones  $Ca^{++}$  explica porque el potencial de inversión de la  $iS_1$  es menos positivo que el potencial de equilibrio del  $Ca^{++}$  y porque la  $iS_1$  no disminuye progresivamente cuando la  $(Ca^{++})_o$  es baja o ausente.

La repolarización del PA cardíaco es difícil de explicar ya que no existe aun un conocimiento exacto de las corrientes iónicas responsables. En FP se ha demostrado la existencia de diversas corrientes involucradas en el mecanismo de repolarización: tres corrientes tiempo-dependientes ( $iK_2$ ,  $iX_1$ ,  $iX_2$ ) y una tiempo-dependiente ( $iK_1$ ). En el miocardio ventricular solamente ha sido posible demostrar una corriente tiempo-dependiente ( $iX_1$ ) y la  $iK_1$ .

La corriente marcapaso ( $iK_2$ ) no aparece en estas fibras que no presentan despolarización diastólica espontánea, bien porque no está presente en este tejido, bien porque queda enmascarado por la acumulación extracelular de  $K^+$ . En cualquier caso su lenta constante de activación no permite suponer que juegue un papel importante en el PA. La corriente de  $Cl^-$  ó corriente dinámica positiva ( $iqr$ ) juega un papel importante en la fase 1 de las FP, pero no aparece tampoco en las fibras musculares ventriculares.

Hoy sabemos que la amplitud y la inclinación de la fase 2 son determinadas por el antagonismo entre dos corrientes de salida ( $iK_1$  e  $iX_1$ ) y una corriente de entrada  $iS_1$ , de tal forma que el final de la fase 2 podría deberse a una activación tiempo-dependiente de la corriente  $iX_1$  ó a la inactivación tiempo-dependiente de la  $iS_1$ . GIEBISH y WEIDMANN (1971) concluyeron que en el músculo ventricular de oveja el factor determinante era la inactivación de la  $iS_1$ . Idénticos resultados fueron obtenidos en fibras musculares ventriculares de perro y gato. McALLISTER y cols. (1975) concluyó, por el contrario, que la inactivación de la corriente  $iX_1$  era el factor más importante en FP.

Existen además de estas corrientes iónicas otras a las que se denomina "corrientes background". Existe: a) una corriente background de  $Na^+$ , que explicaría porque el potencial de membrana es más negativo que el Ena, y que quizás participaría en el plateau del PA, b) una corriente de  $K^+$  que explicaría porque aumenta durante la repolarización la resistencia de la membrana, c) una corriente de  $Cl^-$ , y d) una corriente de Ca.

Recientemente y atendiendo a la corriente iónica responsable de la fase 0 del PA, dos tipos de respuestas cardíacas han sido descritas, cuyas características aparecen comparadas en la Tabla XI (CRANEFIELD y WIT, 1979; RAWLING y FOZZARD, 1979).

A. Respuestas cardíacas rápidas ( $\text{Na}^+$ -dependientes).

Aparecen en las fibras musculares auriculares y ventriculares, así como en las fibras del tejido especializado de conducción ventricular (CRANEFIELD y WIT, 1979; TAMARGO y cols., 1981).

En el PA de las fibras cardíacas rápidas se han diferenciado 5 fases (HOFFMAN y cols., 1960). En la Figura 9 se esquematizan las diversas corrientes iónicas y su posible participación en el PA cardíaco. Las respuestas rápidas se inician por una fase 0 de rápida despolarización que desplaza el potencial de membrana desde el nivel de potencial de reposo ( $-80$  ó  $-90$  mV) hasta valores incluso positivos ( $+20$  ó  $+35$  mV); se denomina "overshoot" a la porción de la fase 0 durante la cual el potencial de membrana alcanza valores positivos. La célula cardíaca en reposo es muy poco permeable al  $\text{Na}^+$ , pero durante la fase 0 del PA, cuando el potencial de membrana alcanza el nivel de potencial umbral, tiene lugar un aumento brusco y masivo de la conductancia de la membrana al  $\text{Na}^+$  (gNa, Fig. 9) (CORABOEUF y cols., 1972; TAMARGO y cols., 1981). Se origina así una corriente rápida de entra-

TABLA XI

PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS RESPUESTAS CARDIACAS  
RÁPIDAS Y LENTAS

Parámetros	R. rápidas	R. lentas
Umbral de activación	-60 a -70 mv	-30 a -45 mv
Potencial de reposo	-80 a -95 mv	-40 a -65 mv
Amplitud	100 - 130 mv	35 - 75 mv
Overshoot	20 - 35 mv	0 - 15 mv
dv/dt	200 - 1000 V/seg	1 - 10 V/seg
Velocidad de conducción	0.5 - 4 m/seg	0,01 - 0,1 m/seg
Factor de seguridad	alto	bajo
Depende de	(Na <sup>+</sup> ) <sub>o</sub>	(Ca <sup>++</sup> ) <sub>o</sub>
Se abole por	Tetrodotoxina	Verapamil, D-600 Prenilamina, Fen- dilina, Perhexi- lina, Diltiazem, Nifedipina, La, Ni, Co, Mn.
Responsable de	Fase 0 de las R. rápidas dv/dt	Fase 0 de las R. lentas Fase 2 de las R. rápidas

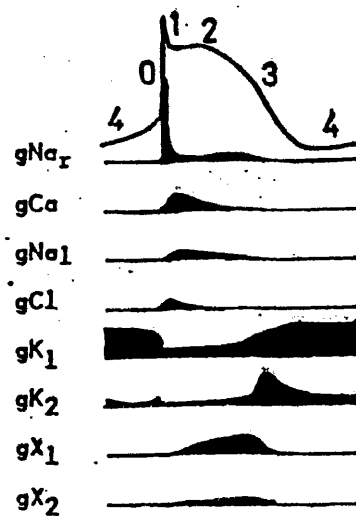


Fig. 9.- Representación de las diversas corrientes iónicas responsables de las diversas fases del potencial de acción cardíaco. Las corrientes se presentan como conductancia (g) a los diversos iones. Véase el texto para su comprensión .

da de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{I}_{\text{Na}}$ , que sería la responsable de la fase 0 de las fibras rápidas. Esta fase de rápida despolarización estaría además facilitada por una disminución instantánea voltaje-dependiente de la conductancia al  $\text{K}^+$ ,  $g\text{K}_1$  (Fig. 9), que impediría que una corriente hacia afuera antagonizase los efectos despolarizantes de una entrada masiva de  $\text{Na}^+$  en la célula cardíaca.

De la activación de la  $\text{I}_{\text{Na}}$  dependen directamente la amplitud y el  $\text{dv/dt}$  del PA cardíaco y puesto que ambos parámetros determinan la velocidad de conducción intracardíaca, esta también guardará una estrecha correlación con la magnitud de la  $\text{I}_{\text{Na}}$ .

A continuación tiene lugar la repolarización celular en la que podemos distinguir 3 fases (HOFFMAN y CRANFIELD, 1960): a) fase inicial de rápida repolarización o fase 1, que ha sido atribuida a la inactivación de la  $\text{I}_{\text{Na}}$ . b) Fase 2 ó meseta. Es una fase de repolarización lenta y sería debida a un aumento de la conductancia al  $\text{Ca}^{++}$  ( $g\text{Ca}$ ) y al  $\text{Na}^+$  ( $g\text{Na}$ ) a través de los canales lentos de la membrana cardíaca, como consecuencia de la activación de una corriente lenta de entrada para ambos iones,  $\text{I}_{\text{Ca}}$  (RAWLING y FOZZARD, 1979). Otros cationes divalentes, estroncio ó bario, también pueden penetrar a través del canal lento de la membrana cardíaca, lo cual habla a favor de la inespecificidad de este canal (KOLHARDT y cols., 1973). Por el contrario, el litio puede sustituir al  $\text{Na}^+$  a través del canal rápido pero no a través del canal lento; por ello en la Figura 9 al  $\text{Na}^+$  que penetra a través del canal lento lo representamos como  $\text{iNa}_{\text{lento}}$  para diferenciarlo del que penetra por el canal rápido,  $\text{iNa}_{\text{rápido}}$ .



c) Fase 3. Durante su curso la repolarización se acelera de nuevo y el potencial de membrana retorna a los niveles de potencial de reposo que la célula poseía antes de ser estimulada. Esta fase es debida tanto a la inactivación de la  $I_{Ca}$ , como a la activación de una corriente de salida de  $K^+$ . Esta corriente de  $K^+$  tiene dos componentes,  $X_1$  y  $X_2$ ; la activación de la  $iX_1$  sería responsable de la repolarización, ya que la  $iX_2$ , por su lenta cinética, apenas si juega papel alguno en el PA cardíaco (NOBLE y TSEIN, 1969).

Se entiende por fase 4 el periodo de tiempo que transcurre desde que se alcanza el nivel de potencial de reposo hasta que se inicia un nuevo PA. Este intervalo es isoelectrico en las fibras cardíacas no automáticas, mientras que en las fibras automáticas (nodo senoauricular, fibras de Purkinje) aparece tras la repolarización una fase 4 de lenta despolarización diastólica que desplaza progresivamente el potencial de membrana hacia valores cada vez menos negativos, hasta que se alcanza el potencial umbral y aparece un nuevo PA.

### B. Respuestas cardíacas lentas ( $\text{Ca}^{++}$ -dependientes).

Aparecen en las células de los nodos senoauricular y A-V, así como en las de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide (CRANEFIELD y WIT, 1979, RAWLING y FOZZARD, 1979). Todas estas células presentan un potencial diastólico máximo y un potencial umbral menos negativo que los de aquellas células que exhiben las respuestas rápidas y presentan una fase 4 de lenta despolarización diastólica. Amplitud y  $dv/dt$  son mucho menores que en el caso de las respuestas rápidas, lo que explica la lenta velocidad de conducción y el bajo margen de seguridad de propagación que las respuestas lentas poseen (Tabla XI ). Las respuestas lentas serían debidas a un aumento de la conductancia al  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Na}^+$  a través de los canales lentos de la membrana cardíaca (CARMELIET y VEREECKE, 1950; CRANEFIELD y WIT, 1979; RAWLING y FOZZARD 1979); es decir, que las respuestas lentas son debidas a la activación de la  $\text{ICa}$ , corriente que en condiciones normales es responsable de la fase 2 del PA cardíaco. La repolarización de estas fibras sería debida a la inactivación de la  $\text{ICa}$  así como a la activación de una corriente de salida de  $\text{K}^+$  ( $\text{IX}_1$ ). Esta corriente  $\text{IX}_1$  sería también la responsable de la despolarización diastólica que aparece en fibras despolarizadas por encima de  $-50 \text{ mV}$ ; en las células del nodo senoauricular la corriente marcapaso es llevada selectivamente por iones  $\text{K}^+$  cuya conductancia disminuye progresivamente durante la diástole (NOMA e IRISAWA, 1976).

Las respuestas lentas están involucradas en la mayoría

de las arritmias porque: a) su pobre velocidad de conducción y su bajo margen de seguridad hace que sean fácilmente bloqueadas en los puntos de bifurcación del sistema His-Purkinje, donde encuentran dificultad para su propagación anterógrada. Dado que bloqueo unidireccional y velocidad de conducción lenta son condiciones necesarias para la reentrada, es fácil comprender que aquellos factores que faciliten la aparición de respuestas lentas facilitarán la aparición de arritmias por reentrada. b) Porque las respuestas lentas están también involucradas en la aparición de oscilaciones y de ritmos ectópicos en fibras despolarizadas, facilitando la aparición de arritmias por alteración del automatismo cardíaco.

MATERIAL Y METODOS

## 1. MATERIAL

### 1.1. ANIMALES.

En nuestros experimentos hemos utilizado ratas blancas Sprague-Dawley de ambos sexos y con pesos comprendidos entre 200-250 gr. y cobayos de ambos sexos y con pesos comprendidos entre 400-500 gr. Los animales procedían del estabulario del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Tanto las ratas como los cobayos se sacrificaban por golpe en la nuca y decapitación posterior. Seguidamente se extraía el corazón que se colocaba en una placa de Petri con líquido Tyrode en el que burbujeaba carbógeno, dentro de la placa se realizaba la disección de las aurículas o de los músculos papilares. A continuación se procedía al montaje de las aurículas. La técnica empleada para el montaje de las aurículas de rata es similar a la descrita por STEWART (1958) para el corazón del cobayo y posteriormente adaptada y modificada para el corazón de rata por SERRANO y cols. (1970).

Las aurículas de rata se fijaban sobre los electrodos de platino por su base y el reborde auricular se ataba al transductor de registro. Tras su montaje en los electrodos, las preparaciones se introducían en copas de ALLHIN que contenían 10 ml de Tyrode en el que burbujeaba una mezcla carbógena (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) mantenida a 34°C. Todas las aurículas eran sometidas a tensión de 1 gr. antes de iniciar el experimento.

y se dejaban estabilizar durante un periodo de 30 minutos antes de iniciar el experimento.

En los cobayos se disecaban los músculos papilares ventriculares de ambos ventrículos, obteniéndose 2 ó 3 preparaciones de cada corazón. Uno de los músculos papilares extraídos se colocaba dentro de una cámara de Lucita de 10 ml. de capacidad y se fijaba sobre una superficie de cera. Los restantes músculos papilares se mantenían en Tyrode oxigenado para su posterior utilización. En la cámara las preparaciones se perfundían de forma continua con solución de Tyrode a una velocidad de 7 ml/min. La solución se mantenía oxigenada con mezcla carbógena (94,9% O<sub>2</sub> y 5,1% CO<sub>2</sub>) y a una temperatura constante de  $34^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante todo el experimento.

## 1.2. APARATOS

### 1.2.1.- COPA

En nuestro trabajo con aurículas de rata, hemos utilizado copas de ALLHIN para órganos aislados de 15 ml de capacidad. Estas copas poseen una doble pared de vidrio, la cual forma parte de un circuito cerrado, por cuyo interior circula agua caliente a una temperatura constante de  $34^{\circ}\text{C}$ , característica ésta que afecta directamente a la preparación y que se lograba por un dispositivo que actuaba como bomba y termostato a la vez, una Ultra Thermostat K5

colora. A su vez la copa poseía una base porosa que permitía el burbugeo generalizado de la preparación con mezcla carbógena (Figura 10 ).

El lavado de las preparaciones se realizaba por rebosamiento del líquido de perfusión (Tyrode). Este líquido de perfusión, antes de llegar a la copa, pasa por un serpentín donde se pone en íntimo contacto con el agua caliente del circuito cerrado del sistema de calentamiento (Figura 11 ) procedente del Ultra-Thermostat K5 colora. De este modo durante el lavado de la preparación no existen diferencias de temperatura en la preparación.

#### 1.2.2.- CAMARA DE LUCITA

En nuestro trabajo con músculos papilares ventriculares de cobayo utilizabamos una cámara de Lucita de 10 ml. de capacidad que tenía una superficie de cera-parafinada sobre la que se sujetaba la preparación mediante alfileres de entomología.

#### 1.2.3.- ELECTRODOS Y SISTEMA DE ESTIMULACION

Para estimular las aurículas de rata hemos utilizado unos electrodos bipolares de plata que van introducidos en un tubo de vidrio incurvado en ángulo recto. El extremo inferior del electrodo está cerrado por una resina epoxi y termina en dos hilos

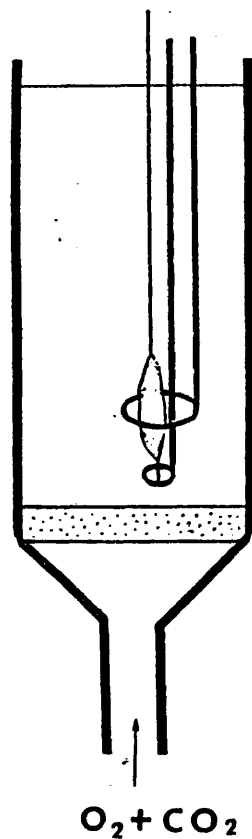
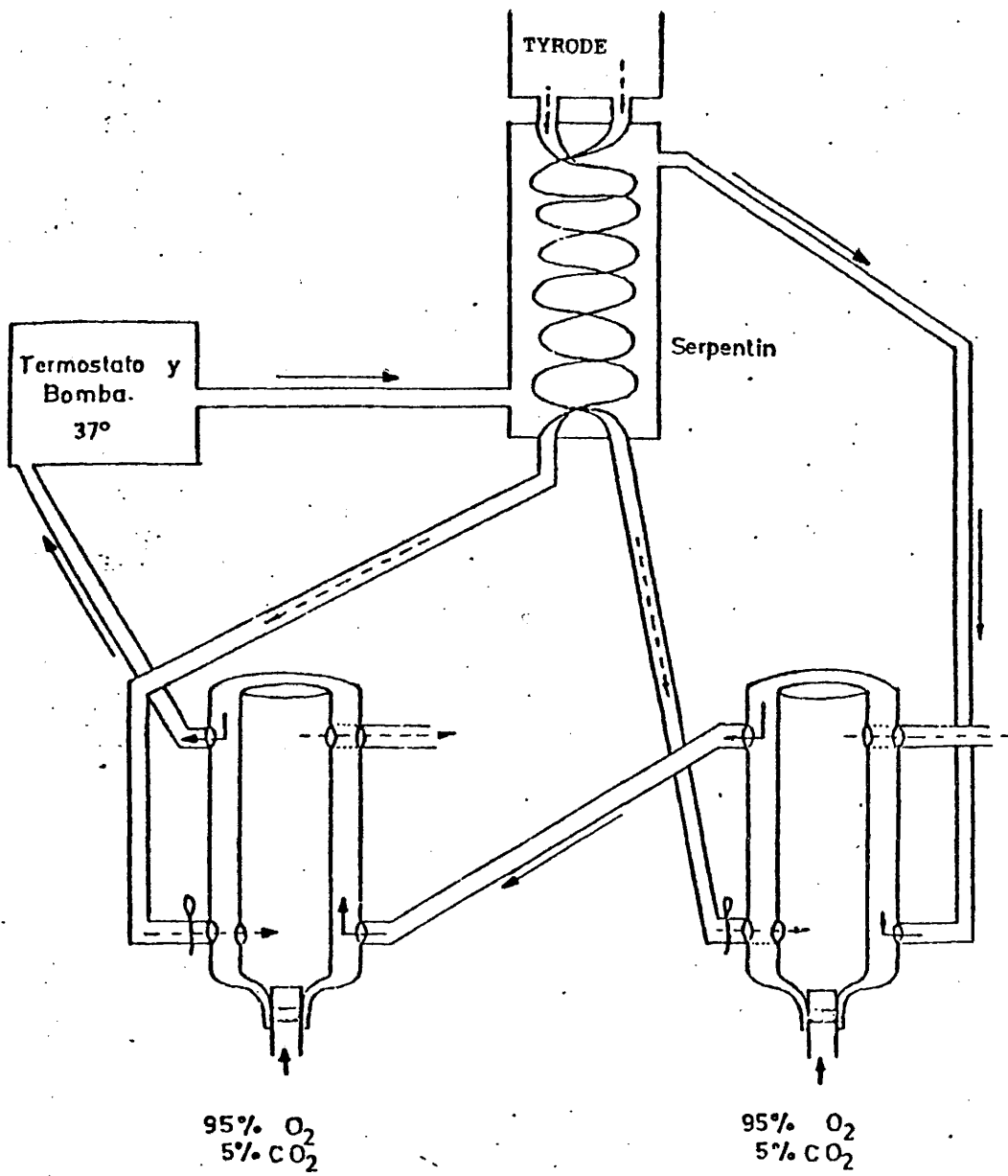


Fig. 10.- Electrodo y copa para estímulo y montaje de aurículas de rata. Los electrodos de plata van enfundados en plástico y dentro de un tubo de vidrio sellado con resina epoxi. El fondo de la copa es una placa porosa que permite la difusión de los gases. Fuera de la copa el vástago de los electrodos va fijo a un soporte externo. El extremo superior de la aurícula va conectado a un transductor de fuerza mediante un hilo con una tensión de 1.0 g.



Figura 11 .



de platino. En el extremo superior los terminales se conectaban a un estimulador GRASS tipo SD9.

Para estimular los músculos papilares ventriculares utilizabamos unos electrodos bipolares de plata, que se colocaban en la base del músculo papilar y un estimulador dirigal.

En todos los experimentos las preparaciones se estimulaban a frecuencias constantes (1 Hz-cobayo o 3 Hz-rata), utilizando pulsos rectangulares de 1 mseg. de duración ( $S_1$ ) y de un voltaje 20-50% superior al voltaje umbral.

#### 1.2.4.- SISTEMA DE REGISTRO

En la aurícula de rata el registro de la fuerza contráctil y de la frecuencia cardíaca se realizaba en un polígrafo GRASS modelo 7 de cuatro canales a través de transductores fuerza-desplazamiento GRASS FT03C.

En los músculos papilares ventriculares de cobayo el registro del potencial de acción (PA) intracelular, se llevó a cabo utilizando microelectrodos de vidrio llenos de ClK 3M y con una resistencia de punta entre 15 y 30 megaohms. La señal se conectaba a amplificadores WPI de alta impedencia de entrada y con una neutralización de capacidad variable. La señal de salida se conectaba a un osciloscopio Tek-

tronix 5130N de memoria y se fotografiaba con una cámara GRASS modelo C-4R utilizando película Kodak de 35 mm. La diferenciación electrónica de la velocidad máxima de despolarización de la fase 0 de PA ( $dv/dt$ ) se realizaba por medio de un diferenciador electrónico (H. Ehler. Homburg/Saar. Alemania).

## 2. METODOS

### 2.1. AURICULAS DE RATA

#### 2.1.1.- AURICULAS DERECHAS

Las aurículas derechas, que latían espontáneamente, se estabilizaron durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se determinaba la frecuencia basal (latidos/min) así como la amplitud de la fuerza contráctil (mg, F.C.). El valor de cada uno de estos parámetros era el promedio de las medidas de 3 contracciones sucesivas registradas a la velocidad máxima de salida del papel (100 mm/seg).

Para determinar el tiempo de recuperación del nodo del seno (TRNS), las aurículas espontáneas se estimulaban a una frecuencia de 5 Hz durante 30 segundos. Al cabo de este tiempo se suspendía la estimulación y se medía el periodo de tiempo comprendido entre el último latido estimulado y el primer latido espontáneo.

La frecuencia máxima de estimulación auricular (F.M.E.) se determina estimulando las aurículas a frecuencias progresivamente crecientes hasta alcanzar una frecuencia a la que las contracciones no seguían la estimulación eléctrica. En estas preparaciones LANDMARK (1975) y TAMARGO (1980) han demostrado que la F.M.E. puede ser utilizada como una medida inversa del periodo refractario (P.R.) auricular.  $PR = 1/FME$ . En esta Tesis Doctoral nosotros hemos utilizado también la F.M.E. para calcular indirectamente el P.R. auricular.

#### 2.1.2- AURICULAS IZQUIERDAS

Las aurículas izquierdas se estimulaban regularmente a una frecuencia basal de 3 Hz. En algunos experimentos después del periodo de equilibrio, el rango de estimulación variaba gradualmente desde 5.0 hasta 0.50 Hz. Los cambios de una frecuencia a otra se realizaban cuando la F.C. de las preparaciones se había estabilizado. Ello permitía la construcción de las curvas fuerza-frecuencia. En preparaciones auriculares izquierdas hemos analizado distintos parámetros contráctiles: amplitud de la fuerza contráctil (FC), tiempo hasta la contracción máxima (TCM), velocidad máxima de contracción ( $+ df/dt \max$ ) ó de relajación ( $- df/dt \max$ ) y el tiempo para la

contracción total (TTC). Las medidas se realizaban a partir de registros de tensión isométricos (Figura 12) y eran siempre la media de 3 concentraciones sucesivas registradas a la velocidad máxima de salida del papel (100 mm/seg).

Para determinar la excitabilidad auricular se estudiaba la relación entre la duración del estímulo catódico (0, 5-30 mseg) y la corriente mínima requerida para evocar la respuesta contráctil. Ello nos permite construir curvas de excitabilidad o de intensidad-voltaje.

Para estudiar los efectos de los antibióticos sobre las respuestas contráctiles lentas las aurículas eran equilibradas durante 30 minutos en solución de Tyrode. A continuación las preparaciones se hacían inexcitables en pocos segundos, al ser despolarizadas por altas concentraciones de  $K^+$  (27 mM) (PAPPANO, 1970; THYRUM, 1974; TAMARGO y cols., 1972). En estas condiciones la excitabilidad y la actividad contráctil eran restauradas (respuestas lentas) en la aurícula despolarizada gracias a la adicción de Isoproterenol ( $10^{-6}M$ ) al baño. Cuando las concentraciones lentas se estabilizaban, la solución era reemplazada por otra conteniendo alto  $K^+$ , Isoproterenol y la concentración deseada de antibiótico, y la amplitud de las contracciones se comparaba con la

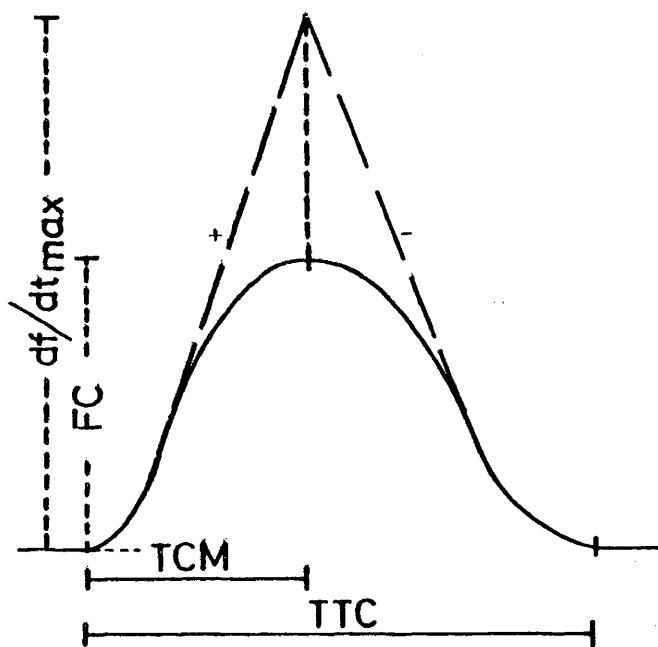


FIGURA 12

obtenida en presencia de Isoproterenol antes de la adición del antibiótico al baño.

## 2.2. MUSCULOS PAPILARES DE COBAYO

Tras la obtención de los valores control, se procedía a la perfusión de la Josamicina disuelta en solución de Tyrode para obtener concentraciones finales comprendidas entre  $10^{-7}M$  y  $10^{-4}M$ .

En algunos experimentos se perfundía por 30 minutos con una sola concentración del fármaco y la preparación se descartaba; en otros experimentos se utilizaban varias concentraciones diferentes del fármaco, perfundiendo por 30 minutos con cada concentración, comenzando con la concentración más baja. Finalizada la perfusión de los fármacos se procedía a lavar la preparación, perfundiéndola con Tyrode normal durante 60 minutos, observándose durante este tiempo si se alcanzaba la recuperación de los valores de control.

De los registros fotográficos se obtenían los siguientes parámetros:

- potencial de reposo (mv), - overshoot (mv), - amplitud del potencial de acción (mv), - velocidad máxima de despolarización durante la fase 0 ó  $dv/dt$  (V/seg.), - duración del potencial de acción (mseg) al 50% ( $DPA_{50}$ ) y al 90% ( $DPA_{90}$ ) de repolarización.

La capacidad de las fibras a responder a frecuencias rápidas de estimulación se determinaba aplicando estímulos a intervalos progresivamente más cortos: 5000, 2000, 1000, 800, 500,

300 mseg.

#### 2.2.1.- CAPACIDAD DE RESPUESTA DE LA MEMBRANA (MEMBRANE RESPONSIVENESS)

Es bien conocida la dependencia existente entre la velocidad máxima de despolarización ( $dv/dt$ ) durante la fase 0 y el nivel de PM al que la excitación tiene lugar. La relación adopta la forma de una función sigmoidea, a la que se denomina curva de Weidmann ó capacidad de respuesta de la membrana. En nuestros experimentos, se determinaba estimulando los músculos papilares a distintos niveles de potencial de membrana inducidos incrementando la concentración extracelular de potasio de 2.7 a 10.8 mM.

#### 2.2.2.- PERIODO REFRACTARIO EFECTIVO (PRE) Y TIEMPO DE RECUPERACION VENTRICULAR

PRE es el periodo de tiempo en el que no se puede inducir un PA propagado. Para su determinación, la preparación se estimulaba a una frecuencia básica (S1) de 1 Hz y a intervalos variables se interpolaba un estímulo prematuro (S2) con un voltaje doble del S1 a través de los electodos de estimulación. El estímulo prematuro se introducía al comienzo de la fase 4 y se iba acercando progresivamente hacia el final del PA hasta que no se obtenía respuesta propagada alguna.

El tiempo de recuperación es el tiempo necesario para que la velocidad de despolarización durante la fase 0



(dv/dt) recupere totalmente su amplitud. Se media introduciendo un extraestímulo ( $S_2$ ), con un voltaje doble del umbral, a intervalos variables con respecto a  $S_1$ . El  $S_2$  se introducía cada 5 estímulos básicos ( $S_1$ ).

#### 2.2.3.- AUTOMATISMO Y APARICION DE LENTA DESPOLARIZACION DIASTOLICA

La aparición de automatismo por lenta despolarización diastólica (fase 4) se inducía en el músculo papilar de cobayo adicionando al líquido de perfusión  $Cl_2Ba$ , 0.2 mM ó Isoproterenol,  $10^{-6}M$  (TEJERINA, TAMARGO y BARRIGON, 1982).

#### 2.2.4.- POTENCIALES DE ACCION $Ca^{++}$ -DEPENDIENTES (PA LENTOS)

Se obtuvieron perfundiendo los músculos papilares con una solución de Tyrode que contenía 27 mM de KCl y a la que se añadía Isoproterenol (0.2 mg/l) (CARMELIET, 1976; TAMARGO, 1979 y 1980).

### 3. FARMACOS UTILIZADOS Y SOLUCIONES

#### 3.1. FARMACOS UTILIZADOS

1) JOSAMICINA	(Novag)
2) ESTEARATO DE ERITROMICINA	(Abbot)
3) ESPIRAMICINA	(Rhodia)
4) OLEANDOMICINA	(Pfizer)
5) CLORHIDRATO DE CLINDAMICINA	(Upjohn)
6) CLORHIDRATO DE LINCOMICINA	(Upjohn)

7) BITARTRATO DE ISOPROTERENOL	(Winthrop)
8) SULFATO DE ATROPINA	(Sigma)
9) CLORHIDRATO DE DIFENIDRAMINA	(Parke Davis)
10) INDOMETACINA	(Merck, Sharp & Dohme)
11) PRACTOLOL	(ICI)
12) BIMALEATO DE METISERGIDA	(Sandoz)
13) CLORHIDRATO DE FENTOLAMINA	(Ciba Geige)
14) CIMETIDINA	(SKF)

Excepto Josamicina y Eritromicina, que fueron disueltas inicialmente con Etanol (0.6%), los restantes fármacos fueron disueltos inicialmente en agua destilada y posteriormente diluidos en Tyrode para obtener el rango de concentraciones deseados ( $10^{-7}\text{M}$ - $10^{-4}\text{M}$ ). Para mantener la estabilidad del Isoproterenol se añadía ácido ascórbico a la solución, que se mantenía en hielo durante el experimento. A lo largo de esta Tesis las concentraciones de todos los fármacos se expresan en molaridades de la sal correspondiente.

### 3.2. LIQUIDO NUTRICIO

El líquido Tyrode-Burn que utilizábamos en nuestros experimentos tenía la siguiente composición en gramos y en miliequivalentes por litro, respectivamente:

ClNa	8.0 g	Na <sup>+</sup>	149.2 mcq/l
ClK	0.2 "	K <sup>+</sup>	2.7 "
Cl <sub>2</sub> Ca	0.2 "	Ca <sup>++</sup>	3.6 "
Cl <sub>2</sub> Mg	0.01"	Mg <sup>++</sup>	0.2 "

NaPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> .....	0.05 g .....	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	0.4 mcq/l
NaCO <sub>3</sub> H .....	1.0 " .....	CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup> .....	11.9 "
Glucosa .....	1.0 " .....		5.0 "
Agua desionizada y bidestilada hasta completar 1000 ml.			

#### 4. ESTADISTICA.

Para comparar los resultados en cada experimento, los valores obtenidos antes de la adición del fármaco fueron utilizados como control, se consideran como 100%, y comparados con los obtenidos 10 ó 30 minutos después de cada incremento en la concentración de fármaco al baño.

Las cifras que aparecen en las distintas tablas representan la media  $\pm$  el error standard de la misma (E.S.M.) para un determinado número (n) de experimentos. La comparación de las medias se realizó utilizando el test de Student para datos pareados y no pareados, considerandose significativa aquellas diferencias en las que  $P < 0.05$ .

RESULTADOS

## 1. EFFECTOS EN AURICULAS AISLADAS DE RATA.

### 1.1. Efectos sobre la frecuencia cardíaca.

En los 69 experimentos control realizados la frecuencia base de la aurícula derecha era de  $192.3 \pm 4.5$  latidos/minuto. Como puede verse en la Figura 13, la administración de Josamicina ( $10^{-7}\text{M}$ - $10^{-4}\text{M}$ ) producía una disminución dosis-dependiente de la frecuencia sinusal, que alcanzaba valores significativos a concentraciones  $\geq 10^{-5}\text{M}$  ( $P < 0.05$ ). Idénticos resultados fueron obtenidos con Eritromicina ( $10^{-7}\text{M}$ - $10^{-4}\text{M}$ ), si bien como se puede observar en la Figura 13, a la concentración  $10^{-5}\text{M}$  el efecto cronotrópico negativo de la Eritromicina era mayor ( $P < 0.01$ ) que el producido por la Josamicina ( $P < 0.05$ ). La administración de Lincomicina, Espiramicina, Oleandomicina y Clindamicina en concentraciones comprendidas entre  $10^{-7}\text{M}$  y  $10^{-4}\text{M}$  no producía cambios significativos en la frecuencia sinusal ( $P > 0.05$ ). Los efectos de la Josamicina y Eritromicina eran fácilmente revertidos tras el lavado de las aurículas con Tyrode normal. Por tanto, el orden de potencia para deprimir la frecuencia sinusal era: Josamicina  $\approx$  Eritromicina  $\gg$  Clindamicina  $\approx$  Espiramicina  $\approx$  Lincomicina  $\approx$  Oleandomicina.

### 1.2. Efectos sobre la fuerza contráctil en aurícula derecha

En los 69 experimentos control realizados la amplitud de la contracción espontánea de A.D. eran de  $595.1 \pm 26.2$  ng. Como se observa en la Figura 14, la Eritromicina producía una de-

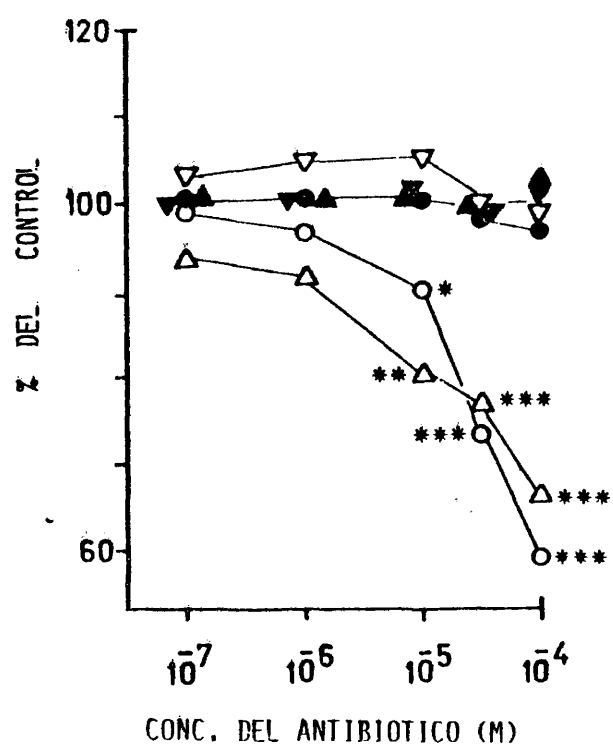


FIGURA 13

Figura 13.- Efecto de la Josamicina (○), Eritromicina (△), Espiromicina (▽), Oleandomicina (▼), Lincomicina (▲) y Clindamicina (●) sobre la frecuencia de aurículas derechas espontáneas de rata. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Concentración molar del fármaco ensayado. Cada punto representa la media de 10 experimentos.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

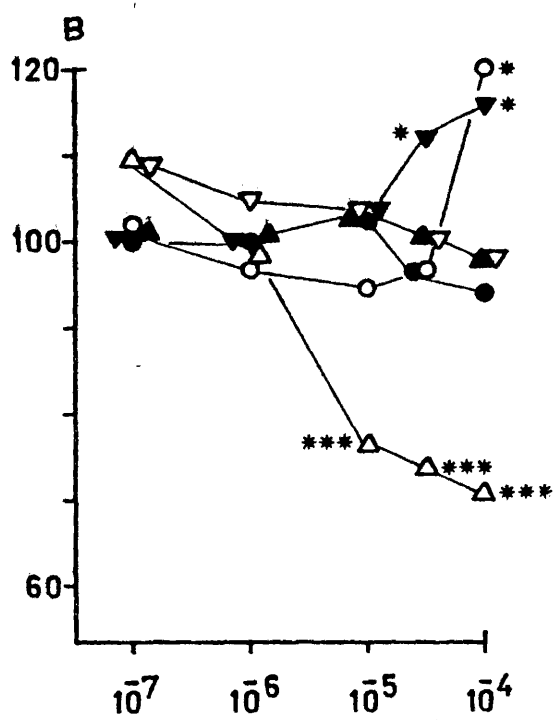


FIGURA 14



Figura 14.- Efecto de la Josamicina (○), Eritromicina (△), Espiramicina (▽), Oleandomicina (▼), Lincomicina (▲), y Clindamicina (●) sobre la fuerza contractil en aurículas derechas espontáneas de rata. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Concentración molar del fármaco ensayada. Cada punto representa la media de 10 experimentos.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

presión dosis-dependiente en la fuerza contráctil. Este efecto inotrópico negativo era significativo ( $P < 0.001$ ) a concentraciones  $\geq 10^{-5}M$ . La Oleandomicina, a concentraciones  $\leq 10^{-5}M$ , no producía cambios significativos en la contractilidad auricular; sin embargo, a concentraciones de  $5 \times 10^{-5}M$  y  $10^{-4}M$  producía un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de la fuerza contráctil. La Josamicina, a concentraciones  $\leq 5 \times 10^{-5}M$  no producía cambios significativos ( $P > 0.05$ ) en la fuerza contráctil; sin embargo, a la concentración de  $10^{-4}M$  la Josamicina producía un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de la contractilidad.

Clindamicina, Espiramicina y Lincomicina a concentraciones de  $10^{-7}M$ - $10^{-4}M$  no producían cambios significativos ( $P > 0.05$ ) de la fuerza contráctil.

De todo lo anterior deducimos que el orden de potencia sobre la contractilidad auricular es: Josamicina  $\approx$  Eritromicina  $\gg$  Clindamicina  $\approx$  Espiramicina  $\approx$  Lincomicina  $\approx$  Oleandomicina.

El efecto depresor de estos antibióticos aparecía a los pocos segundos de su adición al baño, y alcanzaba el efecto máximo a los 5-7 minutos. Tras incubación a las aurículas con solución de Tyrode normal, la contracción volvía gradualmente en 5-10 minutos a valores similares a los registrados durante el control. En ninguno de los experimentos fue posible observar la aparición de contractura (incremento en la tensión diastólica) con ninguna de las concentraciones de antibióticos utilizadas.

### 1.3. Efectos sobre la fuerza contráctil en aurícula izquierda.

En los 69 experimentos control realizados la amplitud de la fuerza contráctil de A.I. conducida era de  $629.7 \pm 24.2$  mg. Como se observa en la Figura 15, la Eritromicina producía una depresión dosis-dependiente de la fuerza contráctil. Esta depresión era significativa ( $P < 0.001$ ) a concentraciones  $\geq 10^{-5}$  M. La Josamicina producía también una depresión dosis-dependiente de la fuerza contráctil. Esta depresión era significativa ( $P < 0.05$ ) a concentraciones  $\geq 10^{-5}$  M.

La Lincomicina a concentraciones  $\leq 5 \times 10^{-5}$  M no producía cambios significativos ( $P > 0.05$ ) en la fuerza contractil; sin embargo, a la concentración de  $10^{-4}$  M producía una disminución significativa de la contracción auricular ( $P < 0.05$ ). La Oleandomicina a concentraciones  $\leq 5 \times 10^{-5}$  M tampoco producía cambios significativos ( $P > 0.05$ ) de la contractilidad; sin embargo a la concentración de  $10^{-4}$  M producía un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de la fuerza contráctil. Clindamicina y Espiramicina a ninguna de las concentraciones utilizadas ( $10^{-7}$  M- $10^{-4}$  M) producían cambios significativos ( $P > 0.05$ ) de la fuerza contráctil. Por tanto, en aurículas izquierdas el orden de potencia inotrópica negativa es: Josamicina = Eritromicina  $>$  Lincomicina  $>$  Clindamicina  $\geq$  Espiramicina = Oleandomicina.

En aurículas izquierdas estimuladas a frecuencia constante hemos determinado también el efecto de estos antibióticos sobre distintos parámetros contráctiles. Los valores controles de estos parámetros obtenidos en 69 preparaciones fueron:

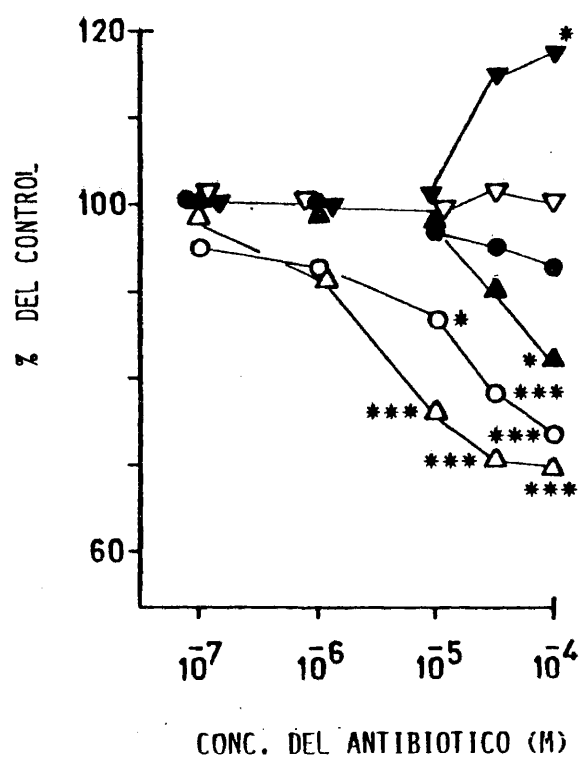


FIGURA 15

Figura 15.- Efecto de la Josamicina (○), Eritromicina (△), Espiromicina (▽), Oleandomicina (▼), Lincomicina (▲) y Clindamicina (●) sobre la fuerza contractil en aurículas izquierdas de rata estimuladas a 3Hz. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Concentración molar del fármaco ensayado. Cada punto representa la media de 10 experimentos.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Tiempo hasta la contracción máxima (TCM) =  $48.6 \pm 1.8$  mg

Tiempo total de contracción (TTC) =  $148.9 \pm 1.9$  mg

Velocidad máxima de contracción (+ df/dtmax) =  $84 \pm 0.4$  mg/mseg y

Velocidad máxima de relajación (- df/dtmax) =

Los efectos de los fármacos ensayados sobre el TCM aparecen ilustrados en la Figura 16A. Como puede verse la Eritromicina a concentraciones  $\geq 10^{-5}$ M producía una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) del TCM. Los restantes antibióticos no modificaban estos parámetros a ninguna de las concentraciones ensayadas. Idénticos resultados fueron observados sobre el TTC (Figura 16B). La Eritromicina y Josamicina a concentraciones  $\geq 10^{-5}$ M, acortaba el + df/dtmax (Figura 17A). Eritromicina además a concentraciones  $\geq 10^{-5}$ M acortaba el -df/dtmax (Figura 17B). Los restantes fármacos no modificaban a ninguna de las concentraciones ensayadas estos parámetros.

#### 1.4. Influencia de la Josamicina sobre la relación fuerza-frecuencia en aurícula izquierda.

En el miocardio de rata la magnitud de la fuerza contráctil está en íntima relación con la frecuencia de estimulación, de tal forma que la fuerza contráctil disminuye cuando la frecuencia de estimulación aumenta y viceversa. Es decir, que en el miocardio de rata y a diferencia de lo que sucede en otras especies un aumento progresivo de la frecuencia de estimulación conduce a una reducción de la fuerza contráctil desarrollada (escalera negativa, KOCH-WESER y BLINKS, 1963). Por ello, hemos estudiado también el efecto de la Josamicina sobre la fuerza contráctil en

100

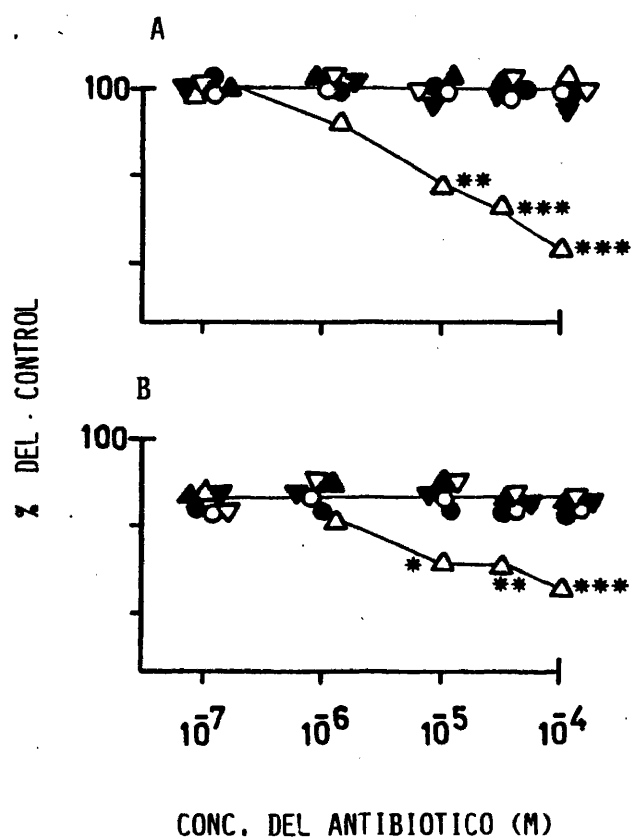


FIGURA 16

Figura 16.- Efecto de la Josamicina (○), Eritromicina (△), Espiromina (▽), Oleandomicina (▼), Linccmicina (▲) y Clindamicina (●) sobre el tiempo para la contracción máxima (A) y el tiempo de contracción total (B) en aurículas izquierdas de rata estimuladas a 3Hz. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Concentración molar del fármaco ensayado. Cada punto representa la media de 10 experimentos.

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.



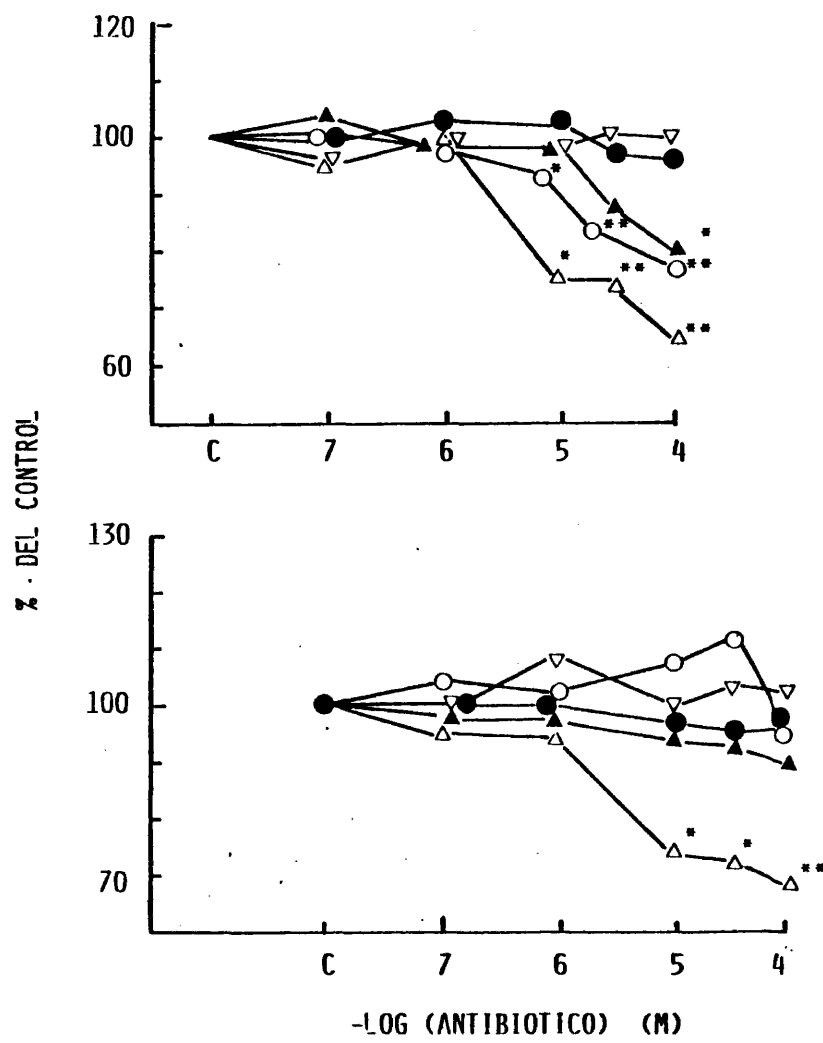


Figura 17.- Efecto de la Josamicina (○), Eritromicina (△), Espiromicina (▽), Oleandomicina (▼), Lincomicina (▲) y Clindamicina (●) sobre el  $+df/dt_{max}$  (A) y  $-df/dt_{max}$  (B) en aurículas izquierdas de rata estimuladas a 3 Hz. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Concentración molar del fármaco ensayado. Cada punto representa la media de 10 experimentos.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

ocho aurículas izquierdas estimuladas a distintas frecuencias (0.5-5Hz). Los resultados aparecen en la Figura 18. En estos experimentos las aurículas eran estimuladas a una frecuencia de 3 Hz durante el periodo de equilibrio. Después las aurículas eran estimuladas a 0.5 Hz, y la frecuencia era incrementada hasta 5Hz. El tiempo para cada cambio de frecuencia venía determinado por el tiempo necesario para alcanzar una respuesta contráctil estable. La fuerza contráctil registrada a 0.5 Hz se consideró como el 100% y el resto de los valores eran expresados como porcentajes de este valor. Josamicina ( $10^{-5}M$  y  $10^{-4}M$ ) producía una disminución en la amplitud de la contracción y desplazaba de forma dosis-dependiente la relación fuerza-frecuencia hacia abajo en todos los rangos de estimulación estudiados.

#### 1.5. Efectos sobre el tiempo de recuperación del nodo del seno (TRNS).

En los 39 experimentos control realizados el tiempo de recuperación del nodo del seno (TRNS) era de  $297.3 \pm 12.5$  mseg como se observa en la Figura 19.

La Josamicina ( $10^{-7}M$ - $10^{-4}M$ ) producía un aumento dosis-dependiente del TRNS. Este aumento era significativo ( $P < 0.01$ ) a concentraciones  $\geq 10^{-5}M$ . El TRNS no pudo ser medido en 4 experimentos tras la adición al baño de la concentración más alta de Josamicina ( $10^{-4}M$ ), porque las aurículas recuperaban su actividad espontánea después de 10 seg de suprimir la estimulación auricular. La Eritromicina producía también un aumento dosis-de-

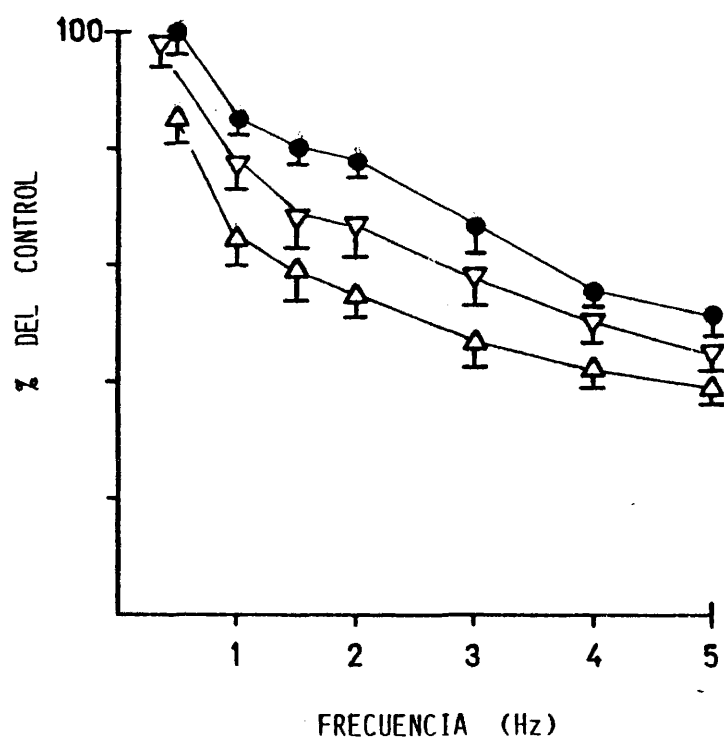


FIGURA 18

Figura 18.- Efecto de la Josamicina sobre la relación fuerza-frecuencia en aurículas izquierdas de rata estimuladas a 3Hz. Ordenadas: % de la contracción registrada a la frecuencia de 0.5 Hz en situación control. Abscisas: Frecuencia de estimulación (Hz). Cada punto representa la media de 8 experimentos, las barras verticales representan el error standard de la media.

(●) control, (▼) Josamicina  $10^{-5}$ M, (Δ) Josamicina  $10^{-4}$ M.

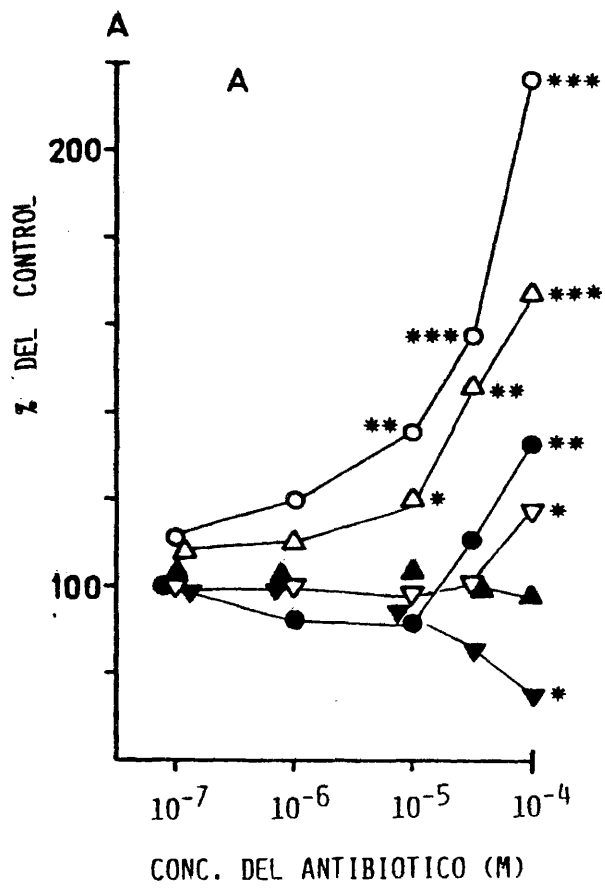


FIGURA 19

Figura 19.- Efecto de la Josamicina (○), Eritromicina (△), Espiromicina (▽), Oleandomicina (▼), Lincomicina (▲) y Clindamicina (●) sobre el tiempo de recuperación del nodo del seno en aurículas espontáneas de rata. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Concentración molar del fármaco ensayado. Cada punto representa la media de 10 experimentos.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

pendiente de TRNS. Este aumento era significativo ( $P < 0.05$ ) a concentraciones  $\geq 10^{-5}M$ . Clindamicina y Espiramicina solo a la más alta concentración utilizada ( $10^{-4}M$ ) producían un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) del tiempo de recuperación del nodo del seno, mientras que la Oleandomicina a esta concentración producía un acortamiento significativo del TRNS ( $P < 0.05$ ). Lincomicina no producía cambios significativos ( $P > 0.05$ ) en el TRNS a ninguna de las concentraciones utilizadas.

#### 1.6. Efectos sobre el periodo refractario (PR) y frecuencia máxima de estimulación auricular (MFE).

En los 36 experimentos control realizados el periodo refractario auricular era  $56.7 \pm 1.7$  mseg. La administración de E-ritromicina producía un aumento dosis-dependiente del PR que alcanzaba valores significativos a concentraciones  $\geq 10^{-6}M$  ( $P < 0.05$ ) (Figura 20). Clindamicina también producía un aumento dosis-dependiente del PR que alcanzaba valores significativos a concentraciones  $\geq 5 \times 10^{-5}M$ . La Josamicina solo aumentaba la máxima frecuencia de estimulación (MFE) auricular a la concentración de  $10^{-4}M$ . Oleandomicina, Espiromicina y Lincomicina no modificaban este parámetro a ninguna de las concentraciones ensayadas ( $P > 0.05$ ).

La MFE auricular era de  $1125.0 \pm 42.5$  latidos/min en las 40 determinaciones control realizadas. Dado que la MFE auricular es la inversa del PR, los datos obtenidos en nuestros experimentos son similares pero de distinto sentido a los descritos para el PR en la Figura 20.



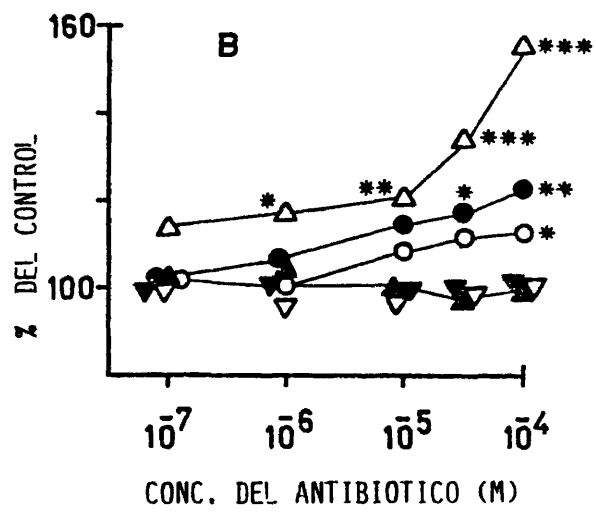


FIGURA 20

Figura 20.- Efecto de la Josamicina (○), Eritromicina (△), Espiromicina (▽), Oleandomicina (▼), Lincomicina (▲) y Clindamicina (●) sobre el periodo refractario efectivo auricular en aurículas espontáneas de rata.

Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Concentración molar del fármaco ensayado. Cada punto representa la media de 10 experimentos.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



1.7. Efectos de varios pretratamientos sobre el efecto inotropico negativo de la Josamicina.

Estos experimentos fueron realizados para determinar si el efecto inotrópico negativo que la Josamicina ejerce sobre la aurícula de rata era el resultado de un efecto directo sobre las fibras auriculares o bien un efecto indirecto mediado a través de la liberación de acetilcolina desde los terminales nerviosos colinérgicos. Puesto que otras sustancias (p.ej. Noradrenalina, Adrenalina, Histamina, 5-Hidroxitriptamina y Prostaglandinas) se sintetizan y almacenan en las fibras auriculares y aumentan la amplitud de la contracción, cabría la posibilidad de que pudieran liberarse desde las fibras auriculares durante su exposición a Josamicina y de que redujesen el efecto inotrópico negativo de este antibiótico. Para descartar estas posibles interferencias hemos estudiado el efecto de la Josamicina sobre contractilidad y la frecuencia auricular en presencia y en ausencia de una mezcla de antagonistas: Fentolamina  $5 \times 10^{-7} \text{M}$ , Practolol  $8 \times 10^{-4} \text{M}$ , Atropina  $5 \times 10^{-7} \text{M}$ , Cimetidina  $4 \times 10^{-5} \text{M}$ , e Indometacina  $2 \times 10^{-5} \text{M}$ . La concentración utilizada de cada antagonista era capaz de abolir el efecto inotrópico positivo o negativo de sus respectivos agonistas en la aurícula aislada de rata. En experimentos control la mezcla de antagonistas no modificaba de forma significativa la frecuencia auricular ( $2.2 \pm 3.2\%$ ,  $P > 0.05$ ) pero si que incrementaba per se en un  $13.9 \pm 5.4\%$  la amplitud de la contracción; sin embargo, este efecto era fugaz y desaparecía a los 10 minutos de haber adicionado la mezcla al baño. Como puede verse

en la Tabla XII tanto el efecto cronotrópico como el efecto inotrópico negativo de la Josamicina ( $10^{-4}M$ ) no era modificado por estos antagonistas ( $26.8 \pm 4.6\%$  comparado con  $29.3 \pm 6.6\%$  para  $P < 0.05$ ).

#### 1.8. Efectos de la Josamicina sobre las respuestas auriculares al Isoprotrenol.

En 19 aurículas derechas e izquierdas hemos estudiado la acción de la Josamicina sobre los efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos del Isoproterenol ( $10^{-11}M$ - $10^{-5}M$ ). Como ya hemos descrito la Josamicina reducía la frecuencia auricular en un  $29.6 \pm 3.4\%$  y aumentaba la amplitud de la contracción en un  $21.2 \pm 2.1\%$ . Sin embargo, la Josamicina no modificaba el efecto cronotrópico e inotrópico positivo del Isoproterenol; como se ve en la Figura 21 las respuestas cronotrópicas e inotrópicas máximas del Isoproterenol no se afectaban en presencia de Josamicina ( $10^{-4}M$ ). El aumento máximo en frecuencia y fuerza contráctil producido por Isoproterenol ( $10^{-5}M$ ) era  $360 \pm 6.2\%$  y  $84.0 \pm 2.6\%$  respectivamente, en aurículas control y  $31.2 \pm 5.1\%$  y  $85 \pm 3.1\%$  respectivamente en presencia de Josamicina ( $P > 0.05$ ).

Los efectos del Isoproterenol también fueron estudiados en 9 aurículas izquierdas estimuladas eléctricamente. La Josamicina ( $10^{-4}M$ ) disminuía la fuerza contráctil en un  $33.1 \pm 4.6\%$  pero sin embargo, no modificaba la respuesta máxima inotrópica positiva del Isoproterenol ( $108.8 \pm 16.8\%$ ) comparada con  $102.3 \pm 17.5\%$  ( $P > 0.05$ , Figura 22 ).

TABLA XII

EFFECTOS DEL PRETRATAMIENTO CON DIVERSOS ANTAGONISTAS DE LA ACCION  
DE LA JOSAMICINA ( $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$ ;  $n=12$ )

PARAMETROS	JOSAMICINA	
	$10^{-5}\text{M}$	$10^{-4}\text{M}$
Frecuencia	$-7.6 \pm 2.8$ ( $-7.2 \pm 3.1$ )	$-46.8 \pm 10.3$ ( $-37.1 \pm 12.9$ )
Contracción AD	$+0.9 \pm 3.9$ ( $+1.2 \pm 6.2$ )	$+28.1 \pm 6.3$ ( $+20.0 \pm 9.0$ )
Contracción AI	$-5.4 \pm 4.6$ ( $-7.6 \pm 4.3$ )	$-26.2 \pm 9.1$ ( $-22.5 \pm 5.3$ )

$n$  = número de experimentos; AD = aurícula derecha, AI = aurícula izquierda.

Los resultados se expresan como porcentaje del valor control.

Los resultados entre paréntesis corresponden a los experimentos realizados en presencia de los antagonistas.

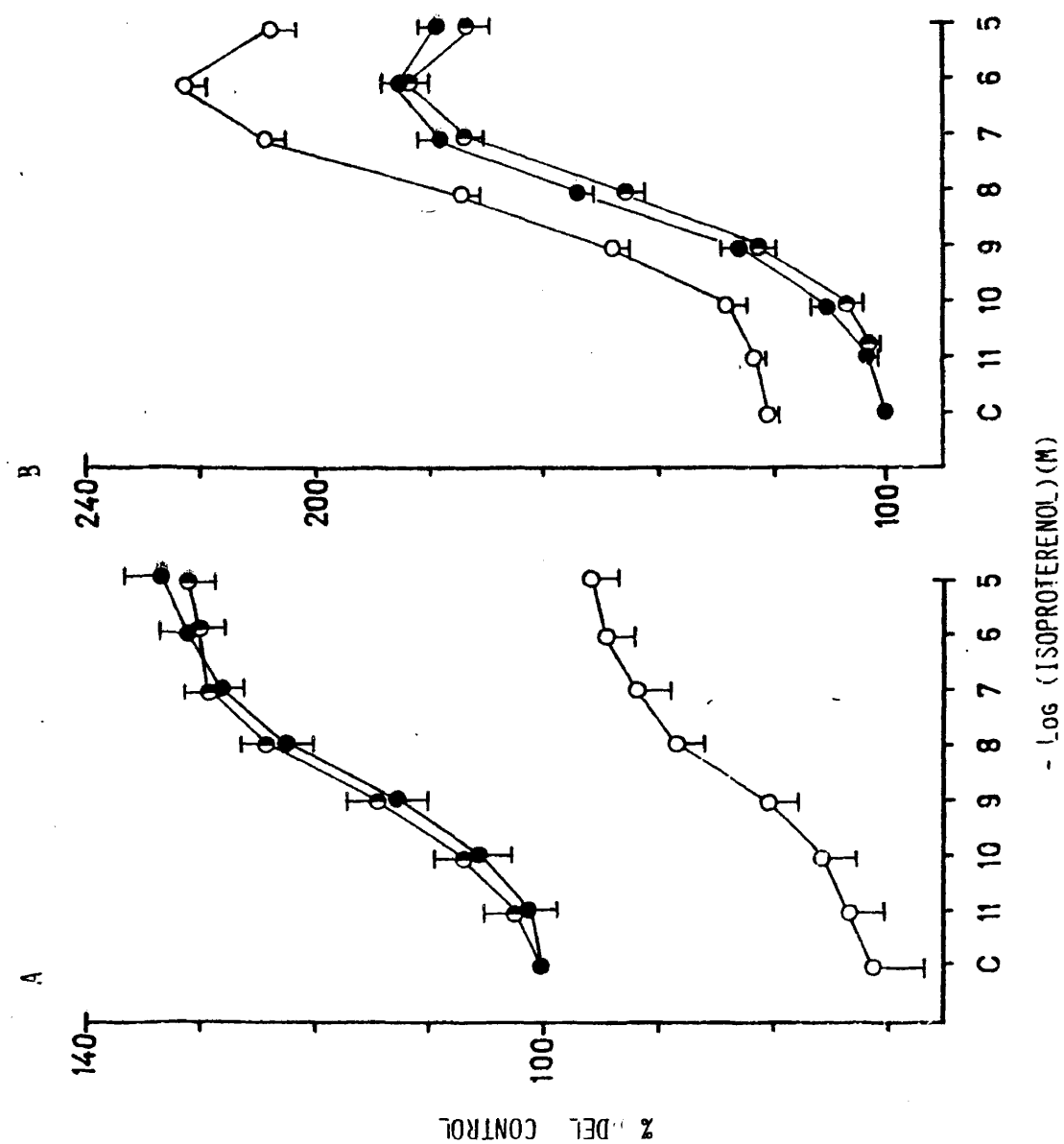


Figura 21.- Efecto de la Josamicina sobre el efecto inotropico (A) y cronotropico (B) positivo inducido por el isoproterenol (ISP) en aurículas derechas espontáneas de rata. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Logaritmo negativo de la concentración molar del ISP. Cada punto representa la media de 10 experimentos. (●) control, (○) Josamicina  $10^{-4}$ M. Los valores obtenidos en presencia de Josamicina se han normalizado (⊙) a fin de ver que no se modifique la dosis-respuesta al ISP en presencia del fármaco. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

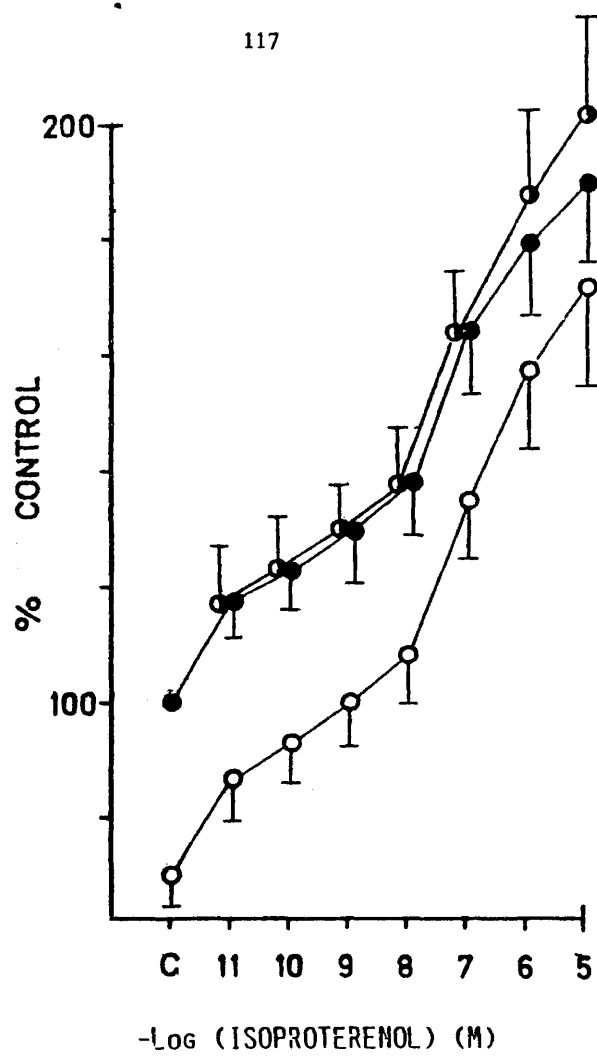


FIGURA 22



Figura 22.- Efecto de la Josamicina sobre el aumento de la contracción inducida por el Isoproterenol (ISP) en aurículas izquierdas de rata estimuladas a 3 Hz. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Logaritmo negativo de la concentración molar del ISP. Cada punto representa la media de 10 experimentos. (●) control, (○) Josamicina  $10^{-4}$ M. Los valores obtenidos en presencia de Josamicina se han normalizado (●) a fin de ver que no se modifica la curva dosis-respuesta al ISP en presencia del fármaco.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 1.9. Efecto de la Josamicina sobre la curva dosis-respuesta al Calcio.

Es bien conocido que un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en el líquido de perfusión aumenta la amplitud de la contracción y el flujo de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  en las células auriculares (NIEDERGERKE, 1963). Por tanto, hemos estudiado en 8 aurículas izquierdas el efecto de la Josamicina sobre la acción inotrópica positiva inducida al incrementar la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en el baño. Los resultados se muestran en la Figura 23. Puede verse que en el rango de concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  ensayadas (0.9 mM-7.0 mM), la relación entre fuerza contráctil y el logaritmo de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  es casi lineal y que la Josamicina ( $10^{-4}\text{M}$ ) produce un desplazamiento paralelo a la derecha de esta relación.

Un cambio similar fue observado en presencia de Eritromicina,  $10^{-4}\text{M}$  (Figura 24).

### 1.10. Efecto de la Josamicina sobre las contracciones lentas inducidas en aurículas despolarizadas.

En otro grupo de experimentos las aurículas se equilibraban inicialmente con Tyrode durante 30 minutos, al cabo de los cuales se perfundían con Tyrode hiperpotásico (27 mM). El aumento de la concentración de potasio ( $[\text{K}^+]_0$ ) suprimía en unos segundos la actividad contráctil auricular, que podía ser restaurada (contracciones ó respuestas lentas) adicionando Isoproterenol ( $10^{-6}\text{M}$ ) al baño. Tras la aparición de las respuestas lentas las

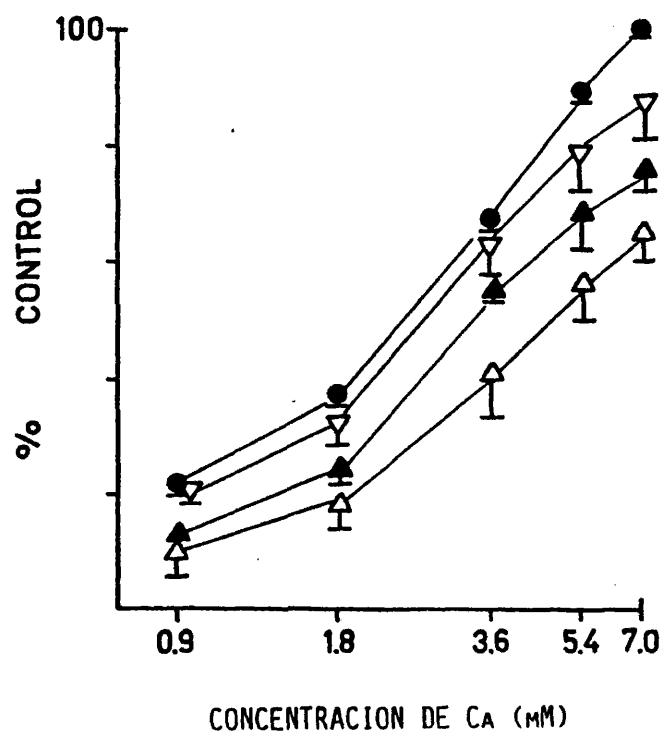


FIGURA 23

Figura 23.- Efecto de la Josamicina sobre el efecto inotropico positivo inducido por el aumento de  $\text{Ca}^{++}$  en el baño en aurículas derechas espontaneas de rata. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Concentración de  $\text{Ca}^{++}$  (mM) en el líquido nutricio en escala logarítmica. (●) Control, (▽) Josamicina  $10^{-5}\text{M}$ , (▲) Josamicina  $5 \times 10^{-5}\text{M}$ , (△) Josamicina  $10^{-4}\text{M}$ . Cada punto representa la media de 8 experimentos. Las barras verticales representan el ESM.

\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

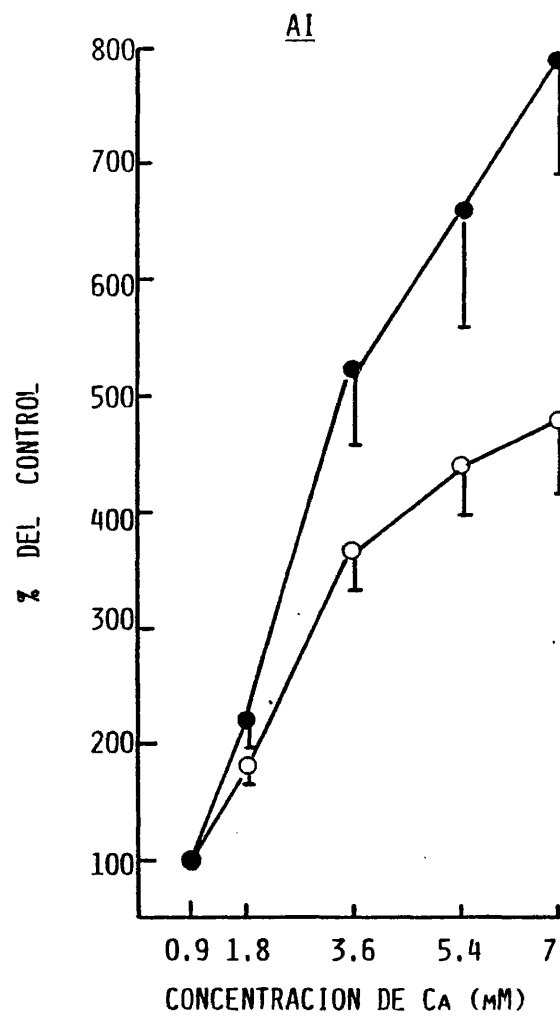


FIGURA 24

Figura 24.- Efecto de la Eritromicina sobre el efecto inotropico positivo inducido por el aumento del  $\text{Ca}^{++}$  en el baño. en aurículas derechas espontáneas de rata. Ordenadas: % del valor control. Abscisas: Concentración de  $\text{Ca}^{++}$  (mM) en el liquido nutricio en escala logarítmica. (●) control, (○) Eritromicina  $10^{-4}\text{M}$ . Cada punto representa la media de 10 experimentos. Las barras verticales representan el ESM.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

preparaciones eran estimuladas a una frecuencia de 0.4 Hz, a fin de evitar su deterioro. Como se ve en la Tabla XIII, Josamicina y Eritromicina a concentraciones  $\geq 10^{-5}M$  producían una disminución dosis-dependiente de la amplitud de las respuestas lentas. Sus efectos depresores eran rápidamente revertidos tras lavar la aurícula con solución Tyrode normal ó incrementando la concentración de  $Ca^{++}$  ( $Ca_o$ ) en el baño Figura 25. En otras palabras, el  $Ca^{++}$  parece antagonizar la depresión inducida por ambos antibióticos sobre las contracciones lentas en la aurícula de rata.

TABLA XIII. EFECTO DE LA JOSAMICINA Y LA ERITROMICINA SOBRE EL EFECTO INOTROPICO POSITIVO DEL ISOPROTERENOL EN AURICULAS DE RATA DESPOLARIZADAS CON 27 mM DE  $K^+$ .

CONCENTRACION	N	EFECTO INOTROPICO (% DE LA DISMINUCION)	
		JOSAMICINA	ERITROMICINA
$10^{-5}M$	8	$9.8 \pm 2.1^*$	$11.9 \pm 2.6^*$
$5 \times 10^{-5}M$	8	$27.7 \pm 3.8^{**}$	$20.6 \pm 4.2^{**}$
$10^{-4}M$	8	$43.2 \pm 3.8^{***}$	$40.0 \pm 5.0^{***}$

N = número de experimentos.  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$



27 mM K MAS ISOPROTERENOL

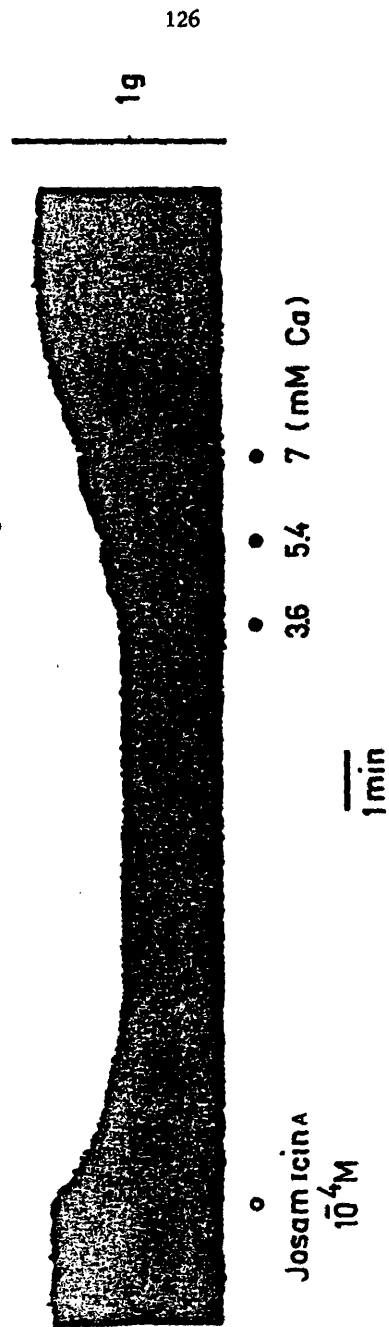


FIGURA 25

Figura 25.- Efecto de la Josamicina ( $10^{-4}\text{M}$ ) sobre las contracciones lentas inducidas por ISP ( $10^{-6}\text{M}$ ) en aurículas izquierdas de rata despolarizadas por (27 mM). Los efectos de la Josamicina fueron revertidos por la adición al baño de  $\text{Ca}^{++}$  en concentraciones crecientes (3.6 - 7.0 mM). La frecuencia de estimulación fue 0.4 Hz durante todo el experimento.

## 2. EFFECTOS EN FIBRAS MUSCULARES VENTRICULARES DE COBAYO.

### 2.1. Efectos de la Josamicina sobre los potenciales de acción rápidos (PV) ventriculares.

Los efectos electrofisiológicos de la Josamicina en un rango de concentraciones comprendido entre  $10^{-7}M$  y  $10^{-4}M$ , fueron estudiados en músculos papilares de cobayo perfundidos con Tyrode y estimulados a una frecuencia basal de 1 Hz. Las preparaciones tras haber sido equilibradas durante 60 min. se perfundían con concentraciones progresivamente crecientes de Josamicina. El tiempo de cada perfusión era de 30 min., ya que experimentos preliminares habían demostrado que el efecto máximo del fármaco se alcanzaba en los primeros 15-20 minutos de haber iniciado la perfusión.

Los resultados obtenidos en 12 experimentos se muestran en la tabla XIV y un experimento típico se muestra en la Figura 26. Como puede verse la Josamicina, a ninguna de las concentraciones ensayadas modifica el potencial de reposo, ni modifica la amplitud, el overshoot o la velocidad máxima de despolarización ventricular ( $V_{max}$ ). El único cambio observado en la configuración del PA ventricular es que la Josamicina produce a concentraciones  $\geq 10^{-6}M$  una prolongación concentración-dependiente de la duración del PA medidos tanto al 50% ( $DPA_{50}$ ) como al 90% ( $DPA_{90}$ ) de repolarización.

El efecto de la Josamicina sobre la duración del PA dependía de la frecuencia de estimulación ventricular. En la Figura 27 se representa la  $DPA_{90}$  en relación con la frecuencia de

EFFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DE LA JOSAMICINA SOBRE LOS PA RÁPIDOS EN MÚSCULOS PAPILARES DE COBAYO  
(n = 11. x ± E.S.M.)

TABLA XIV

CONCENTRACION (M)	POTENCIAL DE REPOSO (mv)	Vmax (V/seg)	AMPLITUD (mv)	DPA <sub>50</sub> (mseg)	DPA <sub>90</sub> (mseg)
0	87.81 ± 1.02	196.00 ± 7.16	118.99 ± 9.14	99.35 ± 11.49	139.28 ± 9.27
10 <sup>-7</sup>	86.83 ± 0.64	196.50 ± 9.12	118.42 ± 2.68	117.33 ± 13.59	160.77 ± 15.96
10 <sup>-6</sup>	88.66 ± 1.06	194.80 ± 6.74	119.66 ± 1.44	129.66 ± 13.35	173.66 ± 14.72*
10 <sup>-5</sup>	89.20 ± 3.16	197.50 ± 7.24	122.13 ± 3.32	145.42 ± 6.50**	187.00 ± 6.13***
10 <sup>-4</sup>	88.70 ± 0.91	199.50 ± 5.80	120.54 ± 1.32	147.92 ± 6.64**	190.64 ± 7.80***

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

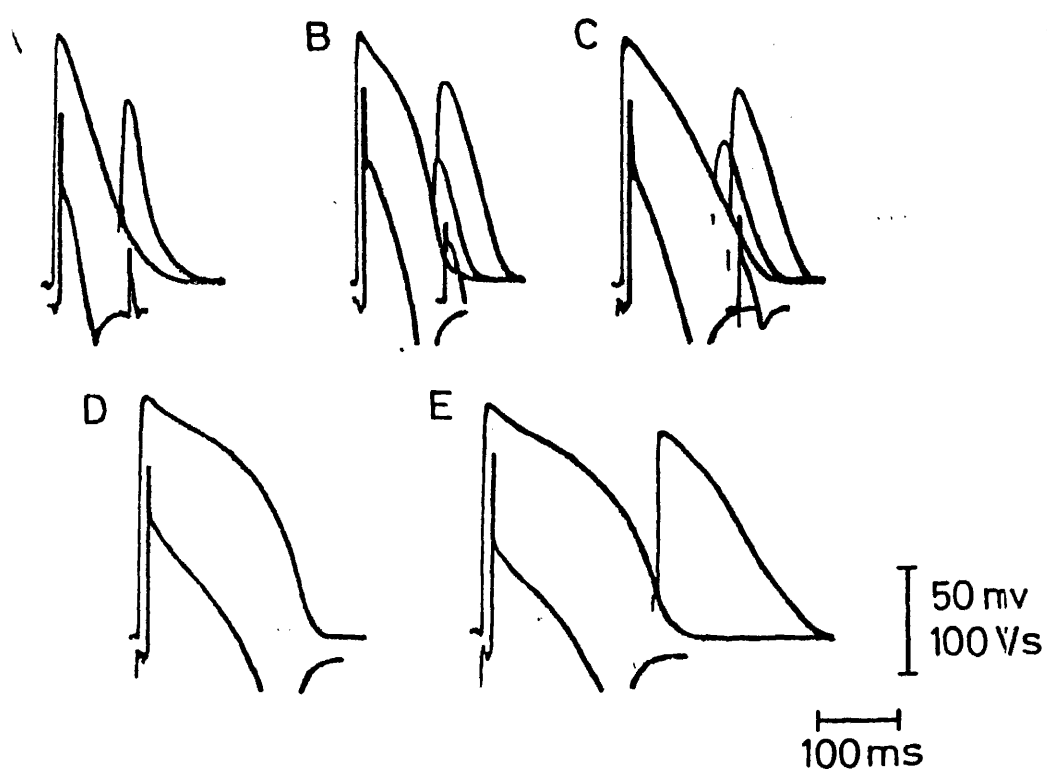


FIGURA 26

Figura 26.- Efecto de la Josamicina sobre el PA ventricular. En cada panel el trazo superior corresponde al potencial de membrana y el inferior a la velocidad máxima de despolarización, A: Control, B-E fueron obtenidas a los 30 minutos de iniciarse la perfusión con Josamicina ( $10^{-7}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-5}M$  y  $10^{-4}M$  respectivamente).

BC

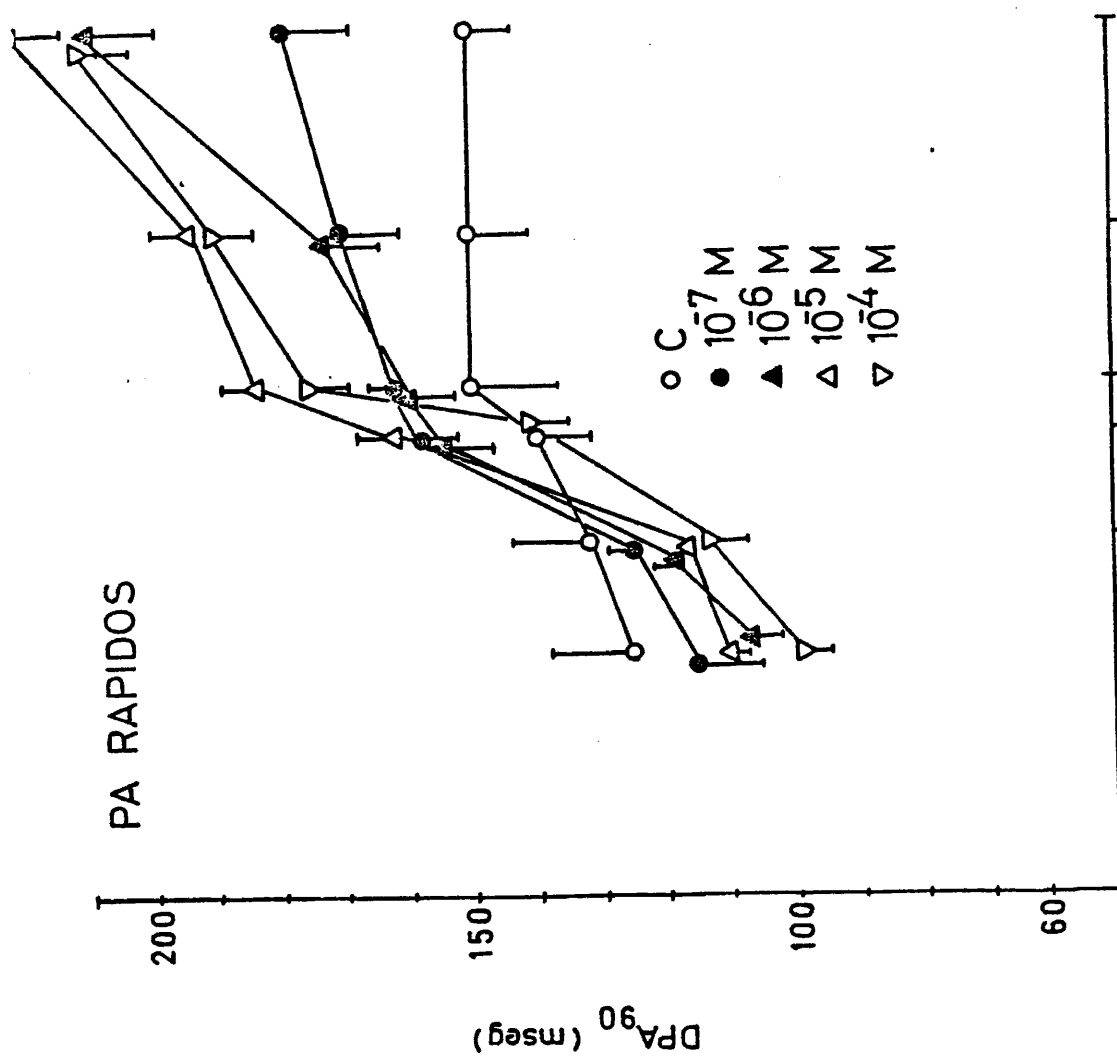


Figura 27.- Efecto de la Josamicina sobre la duración de los PA rápidos en músculos papilares conducidos a distintas frecuencias. Cada punto representa la media de 12 experimentos. Las barras verticales representan el ESM.



estimulación. En situación control, y como ya es bien conocido, la  $DPA_{90}$  se acorta cuando el ventrículo se estimula a frecuencias inferiores a 1 Hz; a frecuencias más lentas la frecuencia no parece influir sobre la  $DPA_{90}$  de ventrículo de cobaya. En presencia de Josamicina se observa que cuando la longitud básica del ciclo de estimulación es superior a 800 mseg el fármaco produce una prolongación dosis dependiente de la  $DPA_{90}$ . Sin embargo a intervalos superiores a los 800 mseg, es decir a frecuencias rápidas, la Josamicina produce un efecto opuesto, es decir, que acorta de forma dosis-dependiente la  $DPA_{90}$ .

## 2.2. Efectos de la Josamicina sobre los potenciales de acción lentos ventriculares.

En un segundo grupo de experimentos hemos estudiado los efectos de la Josamicina sobre los potenciales de acción lentos ó Ca-dependientes, inducidos por el Isoproterenol ( $10^{-6}M$ ) en aurículas despolarizadas por 27 mM de KCl. Los efectos obtenidos en 11 preparaciones se expresan en la tabla XV. Lo primero que llama la atención es que la Josamicina no modifica ni la amplitud ni la velocidad máxima de despolarización ( $V_{max}$ ) ni el potencial de reposo celular, sin embargo, de nuevo la Josamicina produce a concentraciones  $\geq 10^{-5}M$  una prolongación de la  $DPA_{90}$ . A  $10^{-4}$ , este efecto se acompaña de una prolongación de la  $DPA_{50}$ .

La Figura 29 muestra que el efecto de la Josamicina sobre la  $DPA$  de los PA lentos también depende de la frecuencia de estimulación ventricular. En los experimentos que presentamos

TABLA XV

EFFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DE LA JOSAMICINA SOBRE LOS PA LENTOS EN MUSCULOS PAPILARES DE COBAYO

(n = 11.  $\bar{x}$   $\pm$  E.S.M.)

CONCENTRACION (M)	POTENCIAL DE REPOSO (mv)	Vmax (V/seg)	AMPLITUD (mv)	DPA <sub>50</sub> (mseg)	DPA <sub>90</sub> (mseg)
0	42.90 $\pm$ 0.78	9.64 $\pm$ 0.26	77.60 $\pm$ 2.30	179.40 $\pm$ 12.00	204.60 $\pm$ 10.70
10 <sup>-7</sup>	42.90 $\pm$ 0.80	9.65 $\pm$ 0.26	77.60 $\pm$ 2.20	188.60 $\pm$ 10.60	215.20 $\pm$ 12.20
10 <sup>-6</sup>	42.30 $\pm$ 0.80	9.66 $\pm$ 0.21	77.66 $\pm$ 3.65	214.55 $\pm$ 13.00	239.44 $\pm$ 15.12
10 <sup>-5</sup>	42.50 $\pm$ 1.01	9.42 $\pm$ 0.38	79.00 $\pm$ 2.12	214.33 $\pm$ 17.55	245.55 $\pm$ 17.30*
10 <sup>-4</sup>	41.44 $\pm$ 0.89	9.07 $\pm$ 0.31	77.11 $\pm$ 1.44	217.00 $\pm$ 10.45*	245.66 $\pm$ 12.68*

\*P < 0.05

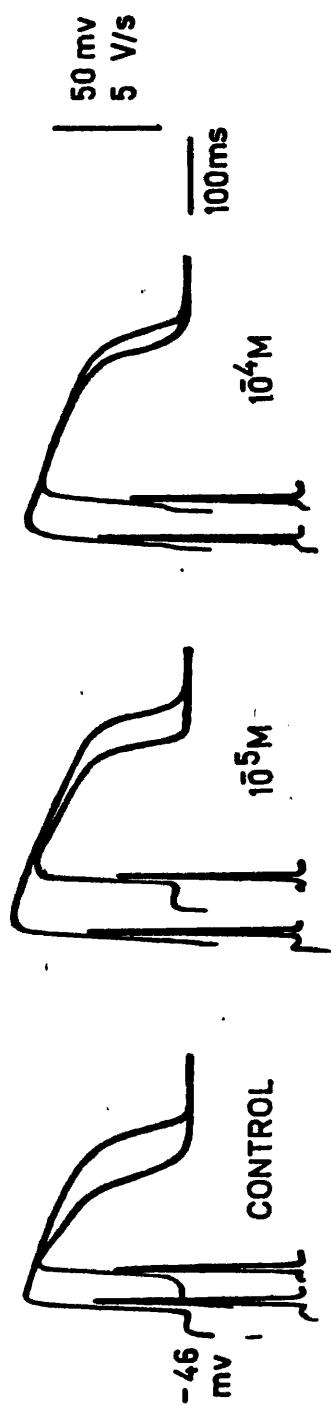


FIGURA 28

**Figura 28.-** Efecto de la Josamicina sobre los potenciales lentos inducidos por el Isoproterenol ( $10^{-6}M$ ) en fibras ventriculares perfundidas con Tyrode 27 mM  $K^{+}$ . Los trazos superiores corresponden al registro del potencial de membrana y los inferiores al registro del  $V_{max}$ . A: control, B y C fueron registrados a los 30 minutos de iniciarse la perfusión con Josamicina,  $10^{-5}M$  y  $10^{-4}M$  respectivamente.

podemos ver que en condiciones control según se prolonga la duración del ciclo básico de estimulación desde 1000 a 900 mseg se produce un claro aumento de la  $DPA_{90}$  de los PA lentos.

En presencia de Josamicina se observa una prolongación dosis-dependiente de la  $DPA_{90}$  que aparece a cualquier frecuencia de estimulación. Un ejemplo de este fenómeno aparece ilustrado en la Figura 28 , donde se registran los PA lentos en situación control, tras 30 min. de perfusión con Josamicina,  $10^{-5}M$  y  $10^{-6}M$  respectivamente; el PA más largo corresponde al obtenido cuando la longitud básica del ciclo era de 9000 mseg y el más corto corresponde a una longitud básica del ciclo de estimulación de 1000 mseg. Puede verse como la Josamicina prolonga la  $DPA_{50}$  en ambos potenciales.

PA LENTOS

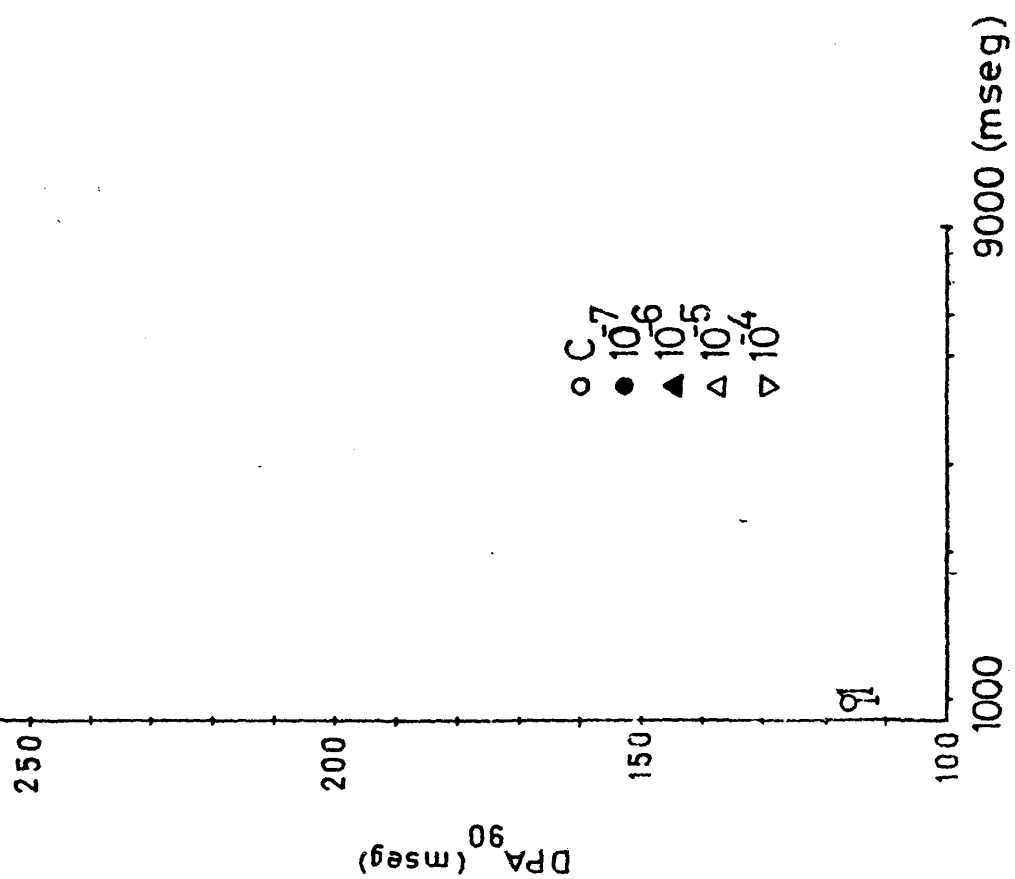


Figura 29.- Efecto de la Josamicina sobre la duración de los PA lentos inducidos por el Isoproterenol en fibras ventriculares despolarizadas conducidas a distintas frecuencias. Cada punto representa la media de 12 experimentos. Las barras verticales representan el ESM.

DISCUSSION



## I. EXPERIMENTOS EN AURICULA AISLADA DE RATA.

Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que la Josamicina un nuevo antibiótico macrólido, produce en la aurícula aislada de rata una disminución dosis-dependiente de la frecuencia sinusal y de la contractilidad auricular. Sin embargo, el efecto inotrópico negativo no aparece en aurículas espontáneas, aunque si es muy marcado en aurículas estimuladas.

La escalera negativa es una característica en el miocardio de rata, e implica que la amplitud de la contracción aumenta cuando la frecuencia de la contracción disminuye (HOLLANDER and WEDD, 1955; KOCH-WESER and BLINKS, 1963). Por tanto la Josamicina al reducir la frecuencia sinusal incrementaría de forma inespecífica la fuerza contráctil, lo que explicaría porque a concentraciones de  $10^{-4}$ M este antibiótico no solo no deprime sino que aumenta la fuerza contráctil auricular. Para evitar esta compensación, el efecto de la Josamicina fue estudiado también en aurículas izquierdas estimuladas a frecuencia constante.

Bajo estas condiciones experimentales, Josamicina producía una depresión dosis-dependiente de la fuerza contráctil y del  $df/dt_{max}$ , lo que confirma el efecto inotropico negativo del fármaco. La duración del estado activo auricular, sin embargo, no parece ser directamente influenciado por la Josamicina, ya que ni el tiempo de contracción total ni el tiempo hasta la contracción máxima fueron significativamente modificados por el antibiótico. Josamicina además prolonga el periodo refractario y el tiempo de recuperación del nodo del seno en la aurícula de rata. Más

aún, la Josamicina ejercía una acción depresora directa sobre el nodo sinusal ya que reducía la frecuencia sinusal y prolongaba el tiempo de recuperación del nodo del seno a concentraciones a las cuales no modificaba la excitabilidad auricular.

De los otros 3 macrólidos estudiados, la Eritromicina producía efectos cardiodepresores completamente similares a los descritos para la Josamicina; sin embargo, la Eritromicina acortaba además el estado activo contráctil por reducir el tiempo hasta la contracción máxima y el tiempo total de contracción auriculares. Estos datos son consistentes con resultados previos obtenidos en preparaciones cardíacas de perro y de gato (COHEN et al. 1970; REGAN et al. 1969) en los que se demostró que la Eritromicina ejercía un efecto inotrópico negativo. Por otro lado, Espiramicina y Oleandomicina, al igual que la Clindamicina y la Lincomicina tan solo a las mayores concentraciones ensayadas producían cambios significativos en alguno de los parámetros electrofisiológicos auriculares ensayados.

No es probable que los efectos producidos por estos antibióticos sean debidos a una acción citotóxica, dado que sus efectos eran rápidamente revertidos con solo reemplazar en el baño la solución con fármaco por una solución libre de fármaco. El efecto inotrópico negativo de la Josamicina no era modificado pretratando las aurículas con una mezcla de antagonistas capaces de bloquear el efecto inotrópico positivo ó negativo de sustancias que normalmente se sintetizan y se liberan en la aurícula (por ejemplo, Noradrenalina, Adrenalina, Acetilcolina, Histamina, 5-Hidroxitriptamina, Prostaglandinas). Estos resultados sugieren

que la Josamicina actuaba directamente sobre las fibras auriculares produciendo un efecto cardiodepresor directo. Más aún, la Josamicina no modificaba el efecto inotrópico y cronotrópico positivo del Isoproterenol en aurículas espontáneas, lo que indicaba que el efecto cardiodepresor de la Josamicina no estaba relacionado con un bloqueo de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos cardíacos.

El incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en el baño ejerce un efecto inotrópico positivo que se acompaña, y que se cree que es debido a un incremento del flujo de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a través del sarcolema de las fibras cardíacas (WINEGRAD and SHANES, 1962; LANGER, 1968). Josamicina y Eritromicina producen un desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis respuesta al  $\text{Ca}^{++}$  lo cual parecía sugerir que ambos fármacos podrían inhibir el flujo de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  en las células auriculares.

Las respuestas lentas inducidas en aurículas despolarizadas con  $\text{K}^+$  también son dependientes de una entrada de  $\text{Ca}^{++}$  dentro de las fibras auriculares, y estas respuestas eran inhibidas tanto por la Josamicina como por la Eritromicina. Por otro lado, los efectos depresivos de las respuestas lentas podían ser reversibles aumentando la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en el líquido de perfusión. Todos estos resultados sugieren que el efecto inotrópico negativo de estos fármacos sería probablemente debido a una disminución en la disponibilidad de  $\text{Ca}^{++}$  para la contracción, quizás porque disminuyen el flujo de entrada  $\text{Ca}^{++}$  a través del sarcolema. La rápida acción de estos fármacos y la excelente recuperación de las aurículas después de suprimir el fármaco sugie-

re que su acción debería estar localizada en la superficie externa de la membrana cardíaca.

Una dependencia similar entre la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en el baño y la reducción de las respuestas contráctiles lentas y de la corriente lenta de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  (IS<sub>1</sub>) fueron previamente descritas para el Verapamil ó el D-600 (KOHLHARDT et al., 1972). Sobre la base de estos resultados se propuso que estos compuestos probablemente competirían con el  $\text{Ca}^{++}$  por un grupo receptor común ó por un sistema especial de transporte localizados en la superficie de la membrana de la célula cardíaca (KOHLHARDT et al., 1972; BAYER y cols., 1975). Como la Josamicina y la Eritromicina, estos antagonistas del  $\text{Ca}^{++}$  desplazaban la curva dosis respuesta a  $\text{Ca}^{++}$  a la derecha pero no abolían la capacidad de respuesta del miocardio a las catecolaminas beta-adrenérgicas (FLEKENSTEIN, 1977). Por lo tanto, aunque el mecanismo preciso a nivel de la membrana cardíaca no está claro, el efecto inotrópico negativo de la Josamicina y Eritromicina podría ser posiblemente explicado asumiendo un efecto inhibitorio reversible de estos antibióticos sobre la disponibilidad del  $\text{Ca}^{++}$  contráctil quizás por actuar en un lugar localizado en la superficie del sarcolema. Sin embargo, los presentes experimentos no prueban que Josamicina y Eritromicina actúen exclusivamente por éste mecanismo. Un efecto intracelular también sería posible dada la alta lipofilidad de estos fármacos (GARROD y cols., 1973; KUCERS and BENNET, 1979). Por otro lado, la reducción de las respuestas contráctiles lentas puede ser también el resultado de un incremento en la  $g_K$  más que una disminución en la entrada de  $\text{Ca}^{++}$ . Sin em-

bargo, este parece ser el mecanismo responsable de la reducción de las respuestas lentas inducidas por Eritromicina, ya que esta aumenta el flujo de entrada de K en el ventrículo del perro (REGAN y cols., 1969).

## II. EFECTOS DE LA JOSAMICINA EN FIBRAS MUSCULARES VENTRICULARES (F.M.V.) DE COBAYO.

Los efectos de la Josamicina en fibras musculares de cobayo demuestran que a ninguna de las concentraciones ensayadas el fármaco modifica la amplitud o el  $V_{max}$  de la fase 0 del potencial de acción. Este hallazgo parece indicar claramente que la Josamicina no modifica la corriente rápida de entrada de Na ( $I_{Na}$ ) en esta preparación. De acuerdo con esta hipótesis está el hallazgo de que en fibras auriculares de rata la Josamicina no modificaba la excitabilidad auricular.

La Josamicina tampoco alteraba el nivel de potencial de reposo, lo que sugiere que el fármaco no modifica la corriente background de  $K^+$  ( $I_{K1}$ ). Sin embargo, la Josamicina producía una marcada prolongación en la duración del potencial de acción, medido este tanto al 50% como al 90% de repolarización. Dado que no han sido realizados estudios de clamp de voltaje es muy difícil determinar que tipos de cambios iónicos serían responsables de este alargamiento. Sin embargo, algunas especulaciones pueden ser hechas. En fibras musculares ventriculares el proceso de repolarización es el resultado de dos movimientos iónicos de signo opuesto (NOBLE, 1979; GIEBISCH y WEIDMANN, 1971):

Por un lado la corriente lenta de entrada de Ca ( $I_{Si}$ ) que tiende a mantener el nivel de plateau y a retardar la repolarización, y por otro lado, la corriente de salida de K ( $I_{K1}$ ) que tiende a acelerar la inclinación de la fase 3 y a acelerar la ve-

locidad de repolarización. En nuestros experimentos la Josamicina prolongaba la duración del PA ya que reducía la inclinación de las fases 2 y 3 del mismo enlenteciendo la velocidad de repolarización. Por tanto, podríamos suponer que la Josamicina: a) aumentaría la  $i_{Si}$ , b) enlentecería la inactivación de la  $i_{Si}$  y c) inhibiría la corriente de salida  $i_{Xi}$ . Pasamos ahora a valorar estas tres opciones.

No parece que la Josamicina aumente la  $i_{Si}$ , ya que el fármaco no aumenta ni la amplitud ni el  $V_{max}$  de los PA lentos, Ca-dependientes inducidos por el isoproterenol en músculos despolarizados por K (27 mM). En esta preparación el  $K^+$  despolariza el potencial de membrana hasta valores por encima del umbral de activación de la  $i_{Na}$  (-55 mv), por lo que esta corriente no puede jugar ningún papel en las respuestas propagadas generadas a este nivel de potencial de membrana, por otro lado el Isoproterenol aumenta la  $i_{Si}$ , facilitando la entrada de Ca al interior de la célula cardíaca, y la aparición de respuestas cardíacas lentas (PAPANO, 1970).

Por tanto, si la Josamicina no altera ni la amplitud ni el  $V_{max}$  de estos PA lentos que son los marcadores electrofisiológicos de la entrada de  $Ca^{++}$  en la célula, difícilmente podemos mantener que la Josamicina aumenta la  $i_{Ca}$ . Por otro lado, los experimentos realizados en la rata y discutidos en el apartado anterior sugieren que la Josamicina de alterar la  $i_{Si}$  lo haría reduciendo la amplitud, pero nunca aumentándola.

La segunda opción, que la Josamicina enlentezca la inac-

tivación de la  $I_{Si}$  (BASSINGTHWAIGHTE y cols., 1976), no podemos discutirlo ya que con nuestros experimentos es imposible valorar la  $\tau_{inac}$  (constante de tiempo de inactivación) de esta corriente. Pese a ello, parece difícil poder admitir que un fármaco que no modifica la amplitud de la  $I_{Si}$  sea sin embargo capaz de modificar su cinética de inactivación.

La tercera opción, que la Josamicina inhiba la conductancia al K es una hipótesis muy atractiva en nuestro caso ya que permitiría explicar no solo el alargamiento de la DPA observada en los PA rápidos sino también en los PA lentos a frecuencias superiores a 1 Hz.

Este efecto no puede ser consecuencia de cambios en la corriente  $I_{X_1}$ , ya que esta corriente se activa durante el PA y permanece activada durante un cierto tiempo después de finalizar la repolarización. Una reducción de la  $gK$  podría ocurrir con la corriente background de K,  $I_{K_1}$ , bien como consecuencia de una reducción en el  $Ca^{++}$  de la membrana (hipótesis del Ca, BRADY, 1964) o como consecuencia de una reducción en la concentración extracelular de K (hipótesis del K extracelular). Según la hipótesis del Ca, el Ca ligado a la membrana no vuelve a valores control al final del PA sino que permanece a niveles inferiores a lo normal durante algún tiempo después de acabar la repolarización. Al re-excitar la célula, la conductancia  $gK_1$  tendería a disminuir más de lo habitual, movería el plateau hacia niveles más positivos y como resultado se prolongaría la duración del PA. Este cambio en la  $gK_1$ , sin embargo, no modificaría el nivel del potencial de re-



posó durante la diástole ya que el nivel del potencial de reposo está cercano al nivel de potencial de equilibrio para el  $K^+$  y a este nivel la conductancia para el  $K^+$  sigue siendo muy superior a la del Na ó Ca.

Esta dependencia de la  $g_K$  de los cambios en el Ca ligado a la membrana (hipótesis de BRADY, 1964) no ha sido demostrado directamente, si bien ha sido sugerida por estudios posteriores realizados con la técnica de clamp de voltaje al observar los cambios en el potencial de equilibrio (BASSINGTHWAIGHTE and REUTER, 1972) y en la magnitud (SIMURDA y cols., 1976) de la  $ISi$  sea ó no correcta.

Según la hipótesis de K extracelular, una caída en la  $g_K$  sería consecuencia de una disminución de la concentración de K extracelular. Esta disminución aparecería como consecuencia de la activación de la bomba de Na, que sería activada por la entrada de iones  $Na^+$  durante la fase O de PA (COHEN y col., 1976).

Más difícil es explicar los mecanismos por los que la Josamicina produce cambios frecuencia-dependientes en la duración del potencial de acción ventricular.

El acortamiento de la duración del PA a frecuencias rápidas podría explicarse por: a) una inhibición de la  $iSi$ , bien debido a una reactivación incompleta de esta corriente o a un aumento de concentración de Ca intracelular. b) un aumento de la corriente de salida de  $K^+$ ,  $iX_1$ , que originaría un aumento de la concentración extracelular de  $K^+$  (KLINE y MORAD, 1976). Esta explicación ha sido válida en el músculo ventricular de rana (CAR-

MELLET y LACQUET, 1958), pero es difícil de admitir en el miocardio ventricular de mamífero, ya que su sensibilidad a cambios de la concentración extracelular de  $K^+$  es baja. c) la estimulación a altas frecuencias aumenta la concentración de  $K^+$  extracelular. Ambos aumentos sabemos que estimulan la bomba electrogénica de Na que generará una corriente hacia afuera repolarizante que acortaría la duración del potencial de acción. Es evidente por lo que hemos indicado que al no haber base científica que explique los mecanismos involucrados en la repolarización del músculo cardíaco, no podemos afirmar cual de las hipótesis estaría involucrada en las acciones de la Josamicina.

¿Son los efectos de la Josamicina especie-dependientes?

A la vista de los resultados obtenidos pensamos que la Josamicina no ejerce idénticos efectos ni existe un mismo mecanismo de acción de la Josamicina en la rata y en el cobaya. En la rata parece claro que los efectos cardiodepresores son consecuencia directa de la acción inhibidora de la Josamicina sobre la corriente lenta de entrada de Ca ( $iCa$ ). Es cierto que, como ya indicamos, exista también una acción depresora del fármaco sobre la  $gK$ , si bien este efecto sería de importancia secundaria a la hora de explicar los efectos que hemos descrito en esta Tesis. Por el contrario, los datos obtenidos en el cobaya son concluyentes y demuestran que la Josamicina no inhibe la  $iCa$ , mas bien, sus acciones parecen estar en relación con una acción inhibidora de la  $gK$ . Si seguimos una comparación similar podríamos preguntarnos si las acciones de la Josamicina descritas en esta Tesis Doctoral podrían ser reproducidas en el hombre al que se le administra este antibiótico. Evidentemente esta pregunta no puede ser contestada, lo cual invalida en absoluto los resultados obtenidos.

### III. POSIBLE REPERCUSION CLINICA DE ESTOS RESULTADOS.

El significado clínico de estos resultados aun no es bien conocido. Sin embargo, y dada la extensa utilización de los macrólidos, nosotros creemos necesario enfatizar sus posibles riesgos. Los niveles plasmáticos obtenidos después de la administración oral de los antibióticos estudiados en esta Tesis oscila entre 0.5-3 mcg/ml.

A estas concentraciones, ninguno de los antibióticos ensayados producía un efecto depresor en la aurícula aislada de rata. Ello podría explicar porque los efectos indeseables cardíacos de estos fármacos tras su administración por vía oral, son poco frecuentes.

Después de una inyección intravenosa o una infusión intravenosa, los niveles plasmáticos alcanzan entre 6-8 mcg/ml ( $10^{-5}M$  a  $10^{-4}M$  GARROD y cols., 1973), y a estas concentraciones en nuestros experimentos, tanto con Josamicina como Eritromicina, producían una clara depresión de la función auricular.

Debe tenerse gran cuidado antes de extrapolar nuestros resultados a la clínica. Aunque los presentes resultados demuestran los efectos cardiodepresores de algunos antibióticos, nuestros experimentos eran agudos y no reproducían con precisión la administración clínica de estos agentes. La Lincomicina producía hipotensión y parada cardiopulmonar cuando se administraba rápidamente y a grandes dosis por vía intravenosa; sin embargo, la

misma dosis de Lincomicina administrada lentamente por vía intravenosa ó por vía oral, era bien tolerada (WAISBREN, 1968). Por tanto un efecto de embolada sobre miocardio no puede ser descartado como responsable de algunos efectos adversos cardiovasculares producidos in vivo por Lincomicina. Esto podría explicar al menos parcialmente, porque la Lincomicina aún a  $10^{-4}$  M era casi inefectiva en la aurícula aislada de rata. Más aún, la administración de grandes dosis de Eritromicina (COHEN y cols., 1970), Lincomicina (WAISBREN, 1968) y Josamicina (KURIAKI y cols., 1969) pueden producir una reducción de la presión arterial, que por vía refleja podría modificar la función cardíaca. Pero a pesar de todas estas dificultades para correlacionar los experimentos in vivo e in vitro, nuestros resultados han demostrado que los antibióticos macrólidos, Josamicina y Eritromicina producen un efecto cardiodepresor directo en fibras auriculares de rata. Estos efectos deben de ser tenidos en consideración siempre que se administren en pacientes con infecciones staphilocócicas severas, especialmente en pacientes con fallos cardíacos o con la función hepática alterada.

## CONCLUSIONES

- 1.- En la presente Tesis Doctoral hemos estudiado los efectos de la Josamicina, un antibiótico macrólido, en fibras auriculares de rata y en músculos papilares de cobayo. En fibras auriculares de rata los efectos fueron comparados con los de otros tres macrólidos (Eritromicina, Espiramicina y Oleandomicina), y con otros dos antibióticos afines (Lincomicina y Clindamicina).
- 2.- En aurículas derechas aisladas de rata, la Josamicina y Eritromicina ( $10^{-7}$ M- $10^{-4}$ M) producían una depresión dosis-dependiente de la frecuencia sinusal. Los restantes antibioticos sin embargo no modificaban este parámetro.
- 3.- En aurículas derechas aisladas de rata tan solo la Eritromicina reducía de forma significativa la contractilidad auricular; Espiramicina, Lincomicina y Clindamicina no la modificaban, mientras que Oleandomicina y Josamicina a las dosis más altas ensayadas la aumentaban.
- 4.- En aurículas izquierdas conducidas a la frecuencia de 3 Hz, Josamicina, Eritromicina y Lincomicina deprimían significativamente la contractilidad, Oleandomicina la aumentaba y Clindamicina y Espiromicina no la modificaban. Estos cambios de la contractilidad se acompañaron de cambios similares en el valor del  $df/dt_{max}$ , sin embargo, y con excepción de la Eritromicina que los acortaba los restantes antibióticos no mo-

dificaban ni el tiempo para la contracción total ni el tiempo hasta la contracción máxima.

- 5.- En aurículas izquierdas la Josamicina ( $10^{-7}$ - $10^{-4}$ M) producía un desplazamiento de la curva fuerza-frecuencia hacia abajo y hacia la derecha que era de similar magnitud a todas las frecuencias ensayadas (0.5-5 Hz).
- 6.- En aurículas derechas espontáneas, Josamicina, Eritromicina, Clindamicina y Espiramicina prolongaba de forma significativa el TRNS, la Oleandomicina lo acortaba mientras que la Lincomicina no modificaba su parámetro.
- 7.- Josamicina, Eritromicina y Clindamicina deprimían la frecuencia máxima de estimulación auricular y prolongaba por tanto el PRE auricular. Los restantes antibióticos, Oleandomicina, Lincomicina y Espiromicina, no modificaban ambos parámetros.
- 8.- El efecto inotrópico negativo de la Josamicina en aurículas izquierdas de rata no era modificado por el pretratamiento con diversos antagonistas (Fentolamina, Practolol, Atropina, Difenilhidramina, Cimetidina, Metisergida e Indometacina), lo que sugiere que el fármaco tendría una acción depresora directa de la contractilidad.
- 9.- La Josamicina no modificaba las respuestas inotrópicas y cro-



notropicas positivas del Isoproterenol ( $10^{-11}$ M- $10^{-6}$ M) en aurículas derechas de rata.

- 10.- La Josamicina ( $10^{-5}$ M y  $10^{-4}$ M) producía un desplazamiento de la curva dosis-respuesta al calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ : 0.9-7.0 mM) hacia la derecha y deprimía las contracciones lentas inducidas por el Isoproterenol en aurículas izquierdas despolarizadas con 27 mM de  $\text{K}^+$ .
- 11.- En músculos papilares de cobayo estimulados a la frecuencia de 1 Hz, la Josamicina ( $10^{-7}$ M- $10^{-4}$ M) no modificaba la amplitud, el  $V_{\text{max}}$  ó el nivel del potencial de reposo de los potenciales de acción ventriculares. Sin embargo prolongaba significativamente la duración del PA tanto al 50% como al 90% de repolarización. Esta prolongación era frecuencia-dependiente, siendo mucho más marcada a frecuencias lentas que a frecuencias rápidas.
- 12.- En músculos papilares de cobayo despolarizados por 27 mM  $\text{K}^+$  la Josamicina no modificaba ni la amplitud, ni el  $V_{\text{max}}$  de los PA lentos, Ca-dependientes, inducidos por el Isoproterenol si bien de nuevo se observa que prolongaba de forma muy significativa la duración de los mismos. Esta prolongación solo aparecía a frecuencias lentas ya que a frecuencias superiores a 1.5 Hz lo que se observa es un acortamiento de la duración de estos potenciales de acción.

13.- Estos resultados sugieren que los efectos de la Josamicina serían especie-dependientes. Así en la rata nuestros resultados demostraron que la Josamicina ejerce un efecto inotrópico directo que parecería estar relacionado con la capacidad para inhibir el flujo de entrada de Ca. En el cobayo, por el contrario, la Josamicina no modifica ni la corriente lenta de entrada de Na ni la corriente lenta de entrada de Ca, ya que no modifica ni el Vmax de los PA rápidos ó lentos. La prolongación de la duración del PA observado sugiere que la Josamicina enlentecería la conductancia al K responsable de la repolarización en el músculo papilar de cobayo, si bien nuestros experimentos no permiten descartar otras posibles explicaciones para este fenómeno tal como se discute en esta Tesis Doctoral.

BIBLIOGRAFIA

- BARTLETT, J.G., CHANG, T.W. and ONDERDONK, A.B. (1978): "Will the real *Clostridium* species responsible for antibiotic-associated colitis please step forward". *Lancet*, 1, 338.
- BARTLETT, J.G., SATTOR, V.L. and FINEGOLD, S. (1972): "Treatment of anaerobic infections with Lincomycin and Clindamycin". *New Eng.J.Med.* 287: 1007.
- BASSINGTHWAIGHTE, J.B., FRY, C.H. and MCGUIGAN, J.A.S. (1976): "Relationship between internal calcium and outward current in mammalian ventricular muscle; a mechanism for the control of the action potential duration?" *J.Physiol.* London, 262, 15-37.
- BASSINGTHWAIGHTE, J.B. and REUTER, H. (1972): "Calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac cells". In: *Electrical Phenomena in the Heart* (ed. de Mello). p. 353-395, Academic Press, New York.
- BAYER, R., HENNEKES, R., KAUFMAN, P. and MANNHOLD, R. (1975): "Inotropic and electrophysiological action of verapamil and D600 in mammalian myocardium. I. Pattern of inotropic effects of the racemic compounds. *Naunyn-Schmiedeberg's arch.Pharmacol.* 290, 49.
- BEATTIE, C.B. (1967): "Toxoplasmosis. In Waterson A.P. (ed). *Recent advances in Medical Microbiology* J. A. Churchill Ltd., p. 318.
- BEDATE, M. (1980): "Macrólidos: Perspectivas terapéuticas con su fundamento farmacológico. Quimioterápicos antibióticos. Fundación García Muñoz. Publicaciones Médicas y Científicas. Valencia.
- BENAZET, F. and DUBOST, M. (1959): "Apparent paradox of antimicrobial activity of spiramycin". *Antibiot.Annual 1958-1959* p. 211.
- BENNER, E.J. and TELLMAN, W.H. (1970): "Pseudomembranous colitis as a sequel to oral lincomycin therapy". *Amer.J.Gastroent.* 54, 55.
- BOWYER, A. and MCCOLL, J. (1966): "The role of erythromycin in pruritus ani". *Lancet* 2, 572.
- BRADY, A.J. (1964): "Excitation and excitation-contraction coupling in cardiac muscle". *Ann.Rev.Physiol.* 26, 341-356.
- BRAUN, P. (1969): "Editorial: Hepatotoxicity of erythromycin". *J.Infect.Dis.* 119, 300.

- BRAUSE, B.D., BORGES, J.S. and ROBERTS, R.B. (1976): "Relative efficacy of clindamycin, Erythromycin and penicillin in treatment of *Treponema pallidum* in skin syphilomas of rabbits. *J.Infect.Dis.* 134, 93.
- BREESE, B.B., DISNEY, F.A., TALPEY, W., GREEN, J.L. and TOBIN, J. (1974): "Streptococcal infections in children. Comparison of the therapeutic effectiveness of erythromycin administered twice daily with erythromycin, penicillin phenoxymethyl and clindamycin administered three times daily". *Am.J.Dis.Child.* 128, 457.
- BURCH, B., QUINN, E., COX, F., MADHAVAN, T., FISHER, E. y ROMING, D. (1976): "Intramuscular Clindamycin for therapy of infective Endocarditis". *Am.J.Cardiol.* 38, 929.
- BURDON, D.W. and GEORGE, R.H. (1978): "Pseudomembranous colitis". *Lancet*, 1, 444.
- CARME LIET, E., XHONNEUX, R., GLABBEEK, A. and RENEMAN, R. (1976): "Electrophysiological effects of Droperidol in different cardiac tissues". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 293, 57-66.
- CARME LIET, E. and LACQUET, L. (1958): "Durée du potentiel d'action ventriculaire de grenouille en fonction de la fréquence. Influence des variations ioniques de potassium et sodium. *Arch.Intern.PhysiolBiochim.* 66, 1-21.
- CARME LIET, E. y VEREECKE, J. (1950): "Adrenaline and the plateau phase of the cardiac action potential: Importance of  $Ca^{++}$ ,  $Na^{+}$  and  $K^{+}$  conductance". *Pflügers Arch.* 313: 300-315.
- CHANG, F.N. and WEISBLUM, B. (1967): "The specificity of Lincomycin binding to ribosomes". *Biochemistry* 6, 836.
- CLARK, C.E., THOMPSON, H., McLEISCH, A.R., POWIS, S.J.A., DORRICKOTT, N.J. and ALEXANDER-WILLIAMS, J. (1976): "Pseudomembranous colitis following prophylactic antibiotics in bowel surgery". *J.Antimicrob.Chemother.* 2, 167.
- COHEN, I., GILES, W. and NOBLE, D. (1976): "Cellular basis for the T wave of the electrocardiogram". *Nature*, 262, 657-661.
- COHEN, L.E., McNEILL, C.J. and WELLS, R.F. (1973): "Clindamycin associated colitis". *JAMA*, 223, 1379.
- COHEN, L.S., WECHSLER, A.S., MITCHELL, J.H. and GLICK, G. (1970): "Depression of cardiac function by streptomycin and other antimicrobial agents". *Am.J.Cardiol.* 26, 505.

- COOKSLEY, W.G.E. and POWELL, L.W. (1977): "Erythromycin jaundice: Diagnosis by an in vitro challenge test". *Aust.N.Z.J. Med.* 7, 291.
- CORABOEUF, E., DEROUBAIX, E. y HOERTER, J. (1972): "Control of ionic permeabilities in normal and ischemic heart". *Cir. Res.* 38: 1, 92-97.
- CRANEFIELD, P.F. and WIT, A.L. (1979): "Cardiac arrhythmias". *Am. Rev.Pharmacol.* 41: 454-472.
- CUNDLIFFE, E. (1969): "Antibiotics and poliribosomes II. Some effects of Lincomycin, spiramycin and streptogramin A in vivo". *Biochemistry* 8: 2063.
- CUNDLIFFE, E. and McQUILLEN, K. (1967): "Bacterial protein synthesis: the effect of antibiotics". *J.Mol.Biol.* 30, 137.
- DALLOS, V. (1975): "Clindamycin a retrospective study of its side-effects". *J.Antimicrob.Chemother.* 1, 411.
- DANTZIG, P.I. (1976): *Arch.Dermat.* 112: 53.
- DAUBECK, J.L., DAUGHETY, M.J. and PETTY, C. (1974): *Anaesthes. Analges.* 53: 563.
- DAVID, N.A. and PORTER, G.A. (1959): "Spiramycin in the treatment of hospitalized patients and in male patients with acute gonorrhoeal urethritis". *Antibiot.Annual 1958-1959* p. 188.
- DESMONTS, G. and COUVREUR, J. (1974): "Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies". *New Engl.J.Med.* 29, 1110.
- DRAPER, M. and WEIDMANN, S.: "Cardiac resting and action potential potentials recorded with an intracellular electrode". *J.Physiol.* 115, 74 (1951).
- DRAVET, C., MESDJIAN, E., CENRAUD, B. and ROGER, J. (1977): "Interaction between carbamazepine and triacetyloleandomycin". *Lancet* 1, 810.
- ECKMAN, M.R., JOHNSON, T. and RIESS, R. (1975): "Partial deafness after erythromycin". *New Engl.J.Med.* 292, 649.
- EDITORIAL (1974): "Colitis associated with clindamycin". *Med.Lett. Drugs Ther.* 16: 73-74.
- EGASHIRA, T., SEKI, M., TAKASHIMA, H., ARAHARA, T., TOYOSHIMA, Y., KAWAHARA, Y., TOKUCHI, Y. and NAKANA, M. (1969): "Pharmacological studies on Josamycin a new antibiotic.

- I. Compative studies on the cardiovascular actions of Josamycin and macrolide antibiotics". *Chemoterapy* 17 (4), 580-589.
- FASS, R.J. and SASLAW, S. (1972): "Clindamycin clinica and laboratory evaluation of parenteral therapy". *Am.J.Med. Sci.* 263: 369.
- FASS, R.J., SCHOLAND, J.F., HODGES, G.R. and SASLAW, S. (1973): "Clindamycin in the treatment of serius anaerobic infections". *Ann.Int.Med.* 78: 853.
- FLECKENSTEIN, A. (1977): "Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle". *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 17, 149.
- FOY, H.M., KENNY, G.E., McMAHAN, R., WANSY, A.M. and GRAYSON, J.T. (1970): "Mycoplasma pneumoniae pneumonia in an urban area". *JAMA*, 214, 1666.
- FRANKLIN, T.J. and SNOW, G.A. (1975): "Biochemistry of antimicrobial action". Ed. Chapman and Hall Ltd. 11 New Fetter Lane, London EC4 4EE.
- FRIEDMAN, G.D., GERARD, M.J. and URY, H.K. (1976): "Clindamycin and diarrhea". *JAMA* 236, 2498.
- GARROD, L.P. and WATERWORTH, P.M. (1962): "Methods of testing combined antibiotic bactericidal action and the significance of the results". *J.Clin.Path.* 15, 328.
- GARROD, L.P., LAMBET, H. and O'GRADY, F. (1973): "Antibiotic and chemotherapy. 4th Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh pag. 173.
- GARROD, L.P. and WATERWORTH, P.M. (1962): "Methods of testing combined antibiotic bactericidal action and the significance of the results". *J.Clin.Path.* 15, 328.
- GEDDES, A.M., DWYER, N.St.J., BALL, A.P. and AMOS, R.S. (1977): "Clindamycin in bone and joint infections". *J.Antimicrob.Chemoth.* 3, 501.
- GEORGE, R.H., SYMONDS, J.M., DIMOCK, F., BROWN, H.D., ARABI, Y., SHINAGAWA, N., KEIGHLEY, M.R.B., ALEXANDER-WILLIAMS, J. and BURDON, D.W. (1978a): "Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis". *Brit.Med.J.* 1, 695.
- GEORGE, W.L., SUTTER, V.L., GOLDSTEIN, E.J.C., LUDWIG, S.L. and FINEGOLD, S.M. (1978b): "Aetiology of antimicrobial

agent associated colitis". Lancet 1, 802.

- GIBSON, G.E., ROWLAND, R. and HECKER, R. (1975): "Diarrhoea and colitis associated with antibiotic treatment". Aust. N.Z.J.Med. 5, 340.
- GIEBISCH, G. and WEIDMANN, S. (1971): "Membrane currents in mammalian ventricular heart muscle fibers using a voltage-clamp technique". J.Gen.Physiol. 57, 290-296.
- GILBERT, F.I. (1962): "Cholestatic hepatitis caused by esters of erythromycin and oleandomycin". JAMA 182, 1048.
- GINSBURG, C.M. and EICHENWALD, H.F. (1976): "Erythromycin: A review of its uses in pediatric practice". J.Pediatrics
- GLASBY, J.S. (1976): "Encyclopaedia of Antibiotics: Printed in Great Britain by William Clowes & Sons. Limited London Beccles and Colchester.
- GOLDBERG, I.H. (1965): "Mode of action of antibiotics". II. Drugs Affecting Nucleic Acid and Protein Synthesis. Amer.J. Med. 39, 722.
- GOTO MASAYASLI y MURAMOTO SHUKEI (1969): "Valoración clínica de la Josamicina en dermatología". Chemotherapy 17, nº 4, 679-683.
- GRIFFITH, R.S. and BLACK, H.R. (1970): "Erythromycin". Med.Clin. North America 54, 1199.
- GUEVARA SOSA, I., AVILA MARINO, O. y cols. (1977): "La Josamicina en las infecciones respiratorias superiores en pediatría. Investigación Médica Internacional 4, 1, 33-36.
- GURWITH, M.J., RABIN, H.R., LOVE, K. and The Cooperative Antibiotic Diarrhoea Study Group (1977): "Diarrhoea associated with clindamycin and ampicillin therapy: Preliminary results of a cooperative study". J.Infect.Dis. (Suppl.) 135, 104.
- HASSAM, Z.A., SHAW, E.J. and SHOOTER, R.A. (1978): "Changes in antibiotic sensitivity in strains of staphylococcus aureus, 1952-78". Brit.Med.J. 2, 536.
- HATANO, H., HARIN, A., KAYABA, T., SAITO, T., TAKAHASHI, N. and IMAI, K. (1969): "Use of Josamycin in ophthalmology". Chemotherapy 17(4), 732-738.
- HAZATO, H., YAMAMOTO, T., TADOKORO, I., KAWAMURO, A.Jr., SUZUKI, K., NISHIOKA, K., OKUGI, H., KAKAMOTO, M., HASHIMOTO,



- K., SAIKI, S. and SAKAI, Y. (1969): "A new antibiotic Josamycin. VIII. Six month chronic toxicity test on Josamycin in rats". Japan J. Antibiotics 22(3), 242-253.
- HOFFMAN, B.F. y CRANFIELD, P.F. (1960): "Electrophysiology of the heart". McGraw Hill Co., New York.
- HOLLANDER, P. and WEBB, J. (1955): "Cellular membrane potentials and contractility of normal rat atrium and the effects of temperature, tension and stimulus frequency". Circulation Res. 3, 604.
- ITO, A., HASEGAWA, H., KURIHARA, M. and TARAO, K. (1969): "Fundamental and clinical studies of Josamycin". Chemotherapy 17(4), 636-641.
- JACKSON, G. and SAUNDERS, K. (1973): "Prosthetic valve diphtheroid endocarditis treated with sodium fusidate and erythromycin". British Heart Journal 35, 931-936.
- JAO, R.L. and FINLAND, M. (1967): "Susceptibility of mycoplasma pneumoniae to 21 antibiotics in vitro". Amer.J.Med.Sci. 253, 639.
- KABINS, S.A. and SPIRA, T.J. (1975): "Outbreak of clindamycin associated colitis". Ann.Intern.Med. 83: 830-831.
- KAPLAN, E. and WEINSTEIN, L. (1968): "Lincomycin". Pediat.Clin. North Amer. 15, 131.
- KARCHMER, A.W., MOELLERING, R.C.Jr., WATSON, B.K. (1975): "Antimicrob.Ag.Chemother. 7, 164.
- KEUSCH, G.T. and PRESENT, D.H. (1976): "Summary of a workshop on clindamycin colitis". J.Infect.Dis. 133, 578.
- KINGERY, F.A.J. (1965): "Imitators of athlete's foot". JAMA, 193, 181.
- KISLAK, J.W., RARAVI, L.M.B., DALY, A.K. and FINLAND, M. (1965): "Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics". Amer.J.Med.Sci. 250, 261.
- KLINE, R. and MORAD, M. (1976): "Potassium efflux and accumulation in heart muscle". Evidence from K<sup>+</sup> electrode experiments. Biophys.J. 16, 367-372.
- KNOTHE, and DETTE, G.A.A. (1977): "Pharmacokinetics of erythromycin". Scot.Med.J. 22.
- KNOX, J.M., RICHARDSON, J.B. and MONTES, L.F. (1964): "Superficial fungus diseases. Diagnosis and treatment". Ind.Med. and Surgery, 33, 813.

- KOCH-WESER, J. and BLINKS, J. (1963): "The influence of the interval between beats on myocardial contractility". *Pharmacol.Rev.* 15, 601.
- KOHLHARD, C.M., BAUER, H., KRAUSE, H. and KLECKENSTEIN, B. (1972): "Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian myocardial fibers by the use of specific inhibitors". *Pflügers Arch.* 335, 309.
- KOLHARDT, M., HAASTART, H.P. y KRAUSE, H. (1973): "Evidence on nonspecificity of the Ca channel in mammalian myocardial fibre membranes". *Pflügers Arch.* 342: 125-136.
- KORZYBSKI, T., KOWSZYKGINDIFER, Z. y KURYLOWICZ, W. (1967): "Antibiotics, origin, natura and properties". Pergamon Press, PWN-Polish Scientific publishers.
- KUCERS, A. and BENNET, N. (Eds.) (1979): "The use of antibiotics. 3th Ed., William Heinemann Medical Books. London.
- KUNNIN, C.M.A. (1967): "Guide to use of antibiotics in patients with renal disease". *Ann.Intern.Med.* 67, 151-158.
- KUO, C.C., WANG, S.P. and GRAYSTON, J.T. (1977): "Antimicrobial activity of several antibiotics and a sulfonamide against chlamydia trachomati, organisms in cell culture". *Antimicrob.Ag.Chemother.* 12, 80.
- KURIAKI, K.H., NIKI, H., SEJIMA, Y., SHIBATA, M., IDA, H., OKABAZI, M. and HASHIMOTO, K. (1969): "A new antibiotic, josamycin. V. Studies on toxicity of josamycin". *Japan J.Antibiotics.* 22, 219.
- LANDMARK, K. and REFSUM, H. (1975): "The effect of calcium, practolol, atropine and phenoxybenzamine on the rat atrial action potential at threshold and supra-threshold stimulation". *Acta Pharamcol.Toxicol.* 37, 317.
- LANGER, G. (1968): "Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility". *Physiol.Rev.*, 48, 708.
- LARSON, H.E., PRICE, A.B., HONOUR, P. and BORRIELLO, S.P. (1978): "Clostridium difficile and the etiology of pseudomembranous colitis". *Lancet* 1, 1069.
- LEADING ARTICLE (1970): "Spiramycin in the treatment of gonorrhoea". *Brit.Med.J.* 2, 129.
- LEADING ARTICLE (1970): "Treatment of whooping cough". *Brit.Med.J.* 2, 619.

- LEADING ARTICLE (1974): "Lincomycin and clindamycin colitis". Brit. Med.J. 4, 65.
- LEE, C.K., BOWIE, W.R. and ALEXANDER, E.R. (1978): "In vitro assays of the efficacy of antimicrobial agent in controlling chlamydia trachomatis propagation". Antimicrob.Ag.Chemother. 13, 441.
- LE FROCK, J.L., KLAINER, A.S., CHEN, S., GAINER, R.B., OMAR, M. and ANDERSON, W. (1975): "The spectrum of colitis associated with lincomycin and clindamycin therapy". J. Infect.Dis. (Suppl.) 131, 108.
- LE MOS, L.B., BABA, N. and DE ARAUJO, O.J. (1976): "Clindamycin-induced pseudomembranous colitis". Ann.J.Clin.Path. 65, 455.
- LEVISON, M.E., BRAN, J.L. and RIES, K. (1974): "Treatment of anaerobic bacterial infections with clindamycin-2 phosphate". Antimicrob.Ag.Chemother. 5, 276.
- LUSK, R.H., FEKETY, F.R.Jr., SILVA, J.Jr., BODENDORFER, T., DEVINE, B.J., KAWANISHI, H., KORFF, L., NAKAUCHI, D., ROGERS, S. and SISKIN, S.B. (1977): "Gastrointestinal side effects of clindamycin and ampicillin therapy". J.Infec. Dis. (Suppl.) 135, 111.
- MAO, J.C.H. and TARDREW, P.L. (1965): "Demethylation of erythromycin by rabbit tissues in vitro". Biochem.Pharmacol. 14, 1049-1058.
- MARDER, H.P. and KAYSER, F.H. (1977): "Transferable plasmids mediating multiple antibiotic resistance in streptococcus faecalis subs P liquefaciens". Antimicrob.Ag.Chemother. 12, 261.
- MARGERLEIN, B.J., BIRKENMEYER, R.D. y KAGAN, F. (1967): Antimicrob. Ag.Chemother. 1966, p. 727.
- MASAKICHI NIKUNI, MASACO OH'ISI, SHIGEO SUDA, MASAO IMAI y TAKAKO TAKAHASHI (1969): "Uso oftálmico de la Josamicina: Departamento of Ophtalmology". Niigata University School of Medicine, Japan.
- MASEL, M.A. (1962): "Erythromycin hepato-sensitivity: A preliminary report of two cases". Med.J.Aust. 1, 560.
- MASHIMO, K., KATO, Y., SAITO, A., TOMISAWA, M., SAKURABA, T., MATSUMOTO, Y., MATSUI, K., CHIBA, A., NAKAYAMO, I. and KOJIMAS, A. (1969): "Laboratory and clinical studies on Josamycin". Chemotherapy 17(4), 604-609.

- MASON, D.J., DIETZ, A., DEBOER, T. (1963): *Antimicrob.Ag.Chemother.* 1962, p.554.
- McALLISTER, R., NOBLE, D. and TSIEN, R. (1975): "Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibers". *J.Physiol.* 274, 217.
- McCORMACK, W.M., GEORGE, H., DONNER, A. et al. (1977): *"Antimicrob.Ag.Chemother.* 12: 630.
- McGEHEE, R.F., SMITH, C.B., WILCOX, C. and FINLAND, M. (1968): "Comparative studies of antibacterial activity in vitro and absorption and excretion of Lincomycin and Clindamycin". *Am.J.Med.Sci.* 256: 279.
- McGUIDE, J.M., BUNCH, R.L., ANDERSON, R.C., BOAZ, H.E., FLYNN, E.H., POWELL, E.H. and SMITH, J.W. (1952): "Ilotycin a new antibiotic". *Antibiot.Chemother.* 2, 281: quoted by abbot laboratories (1966).
- McKENZIE, I. and DOYLE, A. (1966): "Two cases of jaundice following Ilosone". *Med.J.Aust.* 1, 349.
- MEYERS, B.R., KAPLAN, K. and WEINSTEIN, L. (1969): "Microbiological and pharamcological behavior of 7-chlorolincomycin". *Appl.Microbiol.* 17, 653-657.
- MIKUNI, M., OHISHI, M., SUDA, S., IMAI, M. and TAKAHASHI, T. (1969): "Ophthalmic use of Josamycin". *Chemotherapy* 17(4), 739-745.
- MILLER, L.W., BICKHAM, S., JONES, W.L., HEATHER, C.D. and MORRIS, R.H. (1974): "Diphtheria carriers and the effect of erythromycin therapy". *Antimicrob.Ag.Chemother.* 6, 166.
- MINTZ, V., AMIR, J., PINKHAS, J. and DE VRIES, A. (1973): "Transient puceptive deafness due to erythromycin lactobionate". *JAMA* 225, 1122.
- MITSUHASHI, S. (1969): "Laboratory evaluation of Josamycin". *Chemotherapy* 17(4), 567-571.
- MONTGOMERY, C.H. and KNOX, J.M. (1959): "Antibiotics other than penicillin in the treatment of syphilis". *New England J.Med.* 261, 277.
- MUNK, J.F., COLLOPY, B.T., CONNELL, J.L., McTEIGUE, J.J., HUGHES, J.F., HOOD, R.N. and BREEN, K.J. (1976): "Lincomycin-clindamycin-associated pseudomembranous colitis". *Med. J.Aust.* 2, 95.

- NAGURA HIDEAKI, NAGUMO MASAO, MIYAWA MASAZUMI, OGASAWARA SHOJI y HORIKOSHI MASARU (19 ): "Aplicación clínica de Josamicina en odontología". Universidad Médica y Dental de Tokyo. Escuela de Medicina Tokyo. Japón.
- NAKAZAWA, S., ISHIYAMA, M., OTSUKI, M., KAKITA, K. and KIMURA, K. (1969): "Bacteriological study on josamycin". Chemotherapy 17(4), 576-579.
- NAKAZAWA y cols. (1969): "Estudio bacteriológico de la Josamicina". Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Kyoto.
- NAKAZAWA, S., ONO, H., MEKATA, I., GYOTEN, I. and KUBOCHI, J. (1969): "Bacteriological study on clindamycin". Chemotherapy 17(5) 752-757.
- NELSON, J.D. (1969): "Antibiotic treatment of pertussis". Pediatrics, 44, 474.
- NEU, H.C., PRINCE, A., NEY, C.O. and GARVEY, G.J. (1977): "Incidence of diarrhoea and colitis associated with clindamycin therapy". J.Infect.Dis. (Suppl.) 35, 120.
- NOBLE, D. (1979): "The initiation of the heart beat". Second Ed. Oxford University Press. Walton Street Oxford OX2 6DP.
- NOBLE, D. y TSEIN, R.W. (1969): "The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac purkinje fibers". J.Physiol. 200: 205-231.
- NOMA, A. e IRISAWA, H. (1976): "A time and voltage dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell". Pflügers Arch. 336: 251-258.
- OCHI, R. (1970): "The slow inward current and the action of manganese ions in guinea-pig's myocardium". Pflügers Arch. 316, 81.
- O'CONNELL, C.J. and PLANT, M.E. (1969): "Intravenous lincomycin in high doses". Current Therap.Res. 11, 478.
- OLEINICK, N.L. and CORCOZAN, J.W. (1969): "Two types of binding of erythromycin to ribosomes from antibiotic-sensitive and resistant Bacillus subtilis 168". J.Biol.Chem. 244, 727.
- OLIVER, L.E., ISER, J.H., STENING, G.F. and SMALLWOOD, R.A. (1973): "Biliary colic and ilosone". Med.J.Aust. 1, 1148.
- OLIWICK, N.L. (1975): "The erythromycins. En antibiotics 111 Ed. Concoran J.W. and Hahn F.E. Springer-Verlag 396-419.

- OPPENHEIMER, S. and TUCK, M. (1968): "Laboratory and clinical evaluation of 7-chloro-7-deoxy-lincomycin". *Am.J.Med.Sci.* 256: 314.
- OSONO, T., OKA, Y., WATANABE, S., NUMAZAKI, Y., MORIYAMA, K., ISHIDA, H., SUZAKI, K., OKAMI, Y. and UMEZAWA, H. (1967): "A new antibiotic, josamycin". I. Isolation and physico-chemical characteristics. *J.Antibiotics Ser A.* 20(3) 174-180.
- OSONO, T., YANO, K., MIYAMATO, I., WATANABE, S., ISHIDO, H., HASEGAWA, Y., SONEZAKI, I., SATO, T. and TAKAHASHI, I. (1969): "A new antibiotic, Josamycin. III. Bacteriological studies protection against bacterial infections and absorption, distribution, excretion and metabolism". *Japan J. Antibiotics* 22(2), 159-172.
- OSONO, T. y UMEZAWA, H. (1971): "Josamicina un nuevo macrólido de tipo no inductor de resistencias. Drug Action and Drug-Resistance in Bacteria, 41-120. Susumu Mitsuhashi-Gumma University.
- PAPPANO, A.J. (1970): "Calcium-dependent action potentials produced by catecholamines in guinea-pig atrial muscle fiber depolarized by potassium". *Circ.Res.* XXVII, 379-389.
- PELZL, VON H., ZELDER, O. and TAUBER, R. (1970): "Behandlung chirurgischer Infektionen mit lincomycin und 7-chlor-Lincomycin". *Arzheim-Forsch. Drugs Res. Jahrgang* 20, 1.
- PHILIPSON, A., SABATH, L.D. and CHARLES, D. (1973): "Transplacental passage of erythromycin and clindamycin". *New Engl. J.Med.* 288, 1219.
- PICARDI, J.L., LEWIS, H.P., TAU, J.S., PHAIR, J.P. (1975): *J.Neurolurg.* 43: 717.
- PUMAROLA, A. (1980): "Mecanismo de acción de los antibióticos: "Curso sobre antibioticoterapia en Hospital General Nuestra Señora del Mar" Eds. Drobnic, L. y Salva, J.A. Ruan S.A. Madrid.
- QUINNAN, G.V.Jr. and McCABE, W.R. (1978): "Ototoxicity of erythromycin". *Lancet* 1, 1160.
- RAWLING, B.A. y FOZZARD, H.A. (1979): "Effects of imipramine on cellular electrophysiological properties of cardiac Purkinje fibers". *J.Pharmac.Exp.Ther.* 209: 371-375.
- REGAN, T.S., KHAN, M.I., OLDEWURTEL, H.A. and PASSANANTE, A.J. (1969): "Antibiotic effect of myocardial K<sup>+</sup> transport

- and the production of ventricular tachycardia". J. Clin. Invest. 46, 68.
- REUTER, H. (1973): "Divalent cations as charge carriers in excitable membranes". Prog. Biophys. Molec. Biol. 20, 1-44.
- ROBERTSON, M.B., BREEN, K.J., DESMOND, P.V., MASHFORD, M.L. and McHUGH, A.M. (1977): "Incidence of antibiotic-related diarrhoea and pseudomembranous colitis. A prospective study of lincomycin, clindamycin and ampicillin". Med. J. Aust. 1, 243.
- ROBINSON, M.M. (1961): "Antibiotics increase incidence of hepatitis". JAMA 178, 89.
- ROUGIER, O., GARNIER, D., GARGOUIL, Y. and CORABOEUF, E.: Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential". Pflügers Arch. 308, 91 (1969)
- RUBBO, J.T., GERGIS, S.D. and SOKOLL, M.D. (1977): Anaesthes. Analges. 56: 329.
- SABATH, L.D., GERSTEIN, D.A., FINLAND, M. (1968): New Engl. J. Med. 279: 1137.
- SAMUELSON, R.J., GIESECKE, A.H., KALLUS, F.T., STANLEY, V.F. (1975) Anaesthes. Analges. 54: 103.
- SARKANY, I., TÁPLIN, D. and BLACK, H. (1961): "Erythrasma-common bacterial infection of the skin". JAMA 177, 130.
- SCHROETER, A.L., LUCOS, J.B., PRICE, E.V. and FALCONE, V.H. (1972) "Treatment for early syphilis and reactivity of serologic tests". JAMA 221, 471.
- SCOTT, A.J., NICHOLSON, G.I. (1974): "The recognition of pseudomembranous colitis as a clinical entity". Aust. N. Z. J. Med. 4, 502.
- SCOTT, A.J., NICHOLSON, G.I. and KERR, A.R. (1973): "Lincomycin as a cause of pseudomembranous colitis". Lancet 2, 1232
- SERRANO, J.S., LASTRA, L.A. y GARCIA DE JALON, P. (1970): "Independencia del efecto antiarrítmico y el efecto bloqueante beta-adrenérgico en estructuras cardíacas aisladas". XII Reunión Nacional S.E.C.F. Santiago 43.
- SHAMES, J.M., GEORGE, R.B., HOLLIDAY, N.B., RASCH, J.R. and MORGAN, W.J. (1970): "Comparison of antibiotics in the treatment of Mycoplasma pneumonia". Arch. Intern. Med. 125, 680.

- SHERLOCK, S. (1968): "Drugs and the liver". *Brit.Med.J.* 1, 227.
- SHOFER, E.H. and YOW, E.M. (1954): "Clinical evaluation of erythromycin". *Arch.Intern.Med.* 93, 397.
- SIMURDA, J., SIMURDOVA, M., BRAVENY, P., SUMBERA, J. (1976): "Slow inward current and action potentials of papillary muscles under non-steady state conditions". *Pflügers Arch.* 362, 209-218.
- SOUTH, M.A., SHORT, D.H. and KNOX, J.m. (1964): "Failure of erythromycin estolate therapy in utero syphilis". *JAMA* 190, 70.
- STEIGBIGEL, R.T., GREENMAN, R.L. and REMINGTON, J.S. (1975): "Antibiotic combinations in the treatment of experimental staphylococcus aureus infection". *J.Infect.Dis.* 131, 245.
- STEWART, G.A. (1958): "The actions of digitalis leaf preparations and of cardiac glycosides on the isolated right ventricle of the guinea-pig". *J.Pharm.Pharmacol.* 10: 741.
- STRANSBAUGH, L.J., KLINEBOLTON, W. y cols. (1976): "Farmacologia comparada de Josamicina y estearato de Eritromicina". *Antimicrob.Ag.Chemother.* 10 (3), 450-456.
- SUTHERLAND, R. (1962): "Spiramycin a reappraisal of its antibacterial activity". *Brit.J.Pharmacol.* 19, 99.
- SWARTZBERG, J.E., MARESCA, R.M. and REMINGTON, J.S. (1977): "Clinical study of gastrointestinal complications associated with clindamycin therapy". *J.Infect.Dis.* (Suppl.) 135, 99.
- TAKADA, M., MORI, S. and SANO, S. (1969): "Experimental and clinical studies on josamycin in the gynecological field". *Chemotherapy* 17(4) 709-716.
- TAMARGO, J., RODRIGUEZ, S. and GARCIA DE JALON, P. (1979): "Electrophysiological effects of desipramine on guinea-pig papillary muscles". *Eur.J.Pharmacol.* 55, 171.
- TAMARGO, J. (1980): "Electrophysiological effects of bunaphtine on isolated rat atria". *Eur.J.Pharmacol.* 62: 81-88.
- TAMARGO, J. y MANZANARES, J. (1980): "Mecanismos electrofisiológicos de las arritmias post-infarto". *Arch.Fac.Med. Madrid Vol. XXXVIII* 3: 111-140.
- TAMARGO, J., TEJERINA, T. y BARRIGON, S. (1981): "Efectos de la



- desmetilimipramina (DMI) sobre diversas formas de automatismo ventricular". *Rev.Esp.Cardiol.* 34: 1-25.
- TARDREW, P.L., MAO, J.C.H. and KENNEY, D. (1969): "Antibacterial activity of 2'-esters of erythromycin". *Appl.Microbiol.* 18, 159.
- TARR, M. (1971): "Two inward currents in frog atrial muscle". *J. Gen.Physiol.* 58, 523.
- TEDESCO, F.J., BATON, R.W., ALPHERS, D.H. (1974): "Clindamycin associated colitis". *Ann.Intern.Med.* 81, 429-433.
- TEJERINA, T., TAMARGO, J. y BARRIGON, S. (1982): "Efectos de la to-cainida y del IQB-M-81 en el miocardio aislado de rata". VII Reun.Nac. A.E.F. Salamanca.
- THYRUM, P.T. (1974): "Inotropic stimuli and systolic transmembrane calcium flow in despolarized guinea-pig atria". *J. Pharmacol.Exp.Ther.* 188(1), 166-179.
- TICKTIN, H.E. and ZIMMERMAN, H.J. (1962): "Hepatic dysfunction and jaundice in patients receiving triacetyloleandomycin". *New Engl.J.Med.* 267, 964.
- TOKUDA, G., YUASA, M., MIHARA, S. and KANO, M. (1969): "On the study of Josamycin in obstetric and gynecological fields". *Chemotherapy* 17(4), 717-720.
- TRIGGS, E.J. and ASHLEY, J.J. (1978): "Oral administration of ery-thromycin stearate: effect of dosage form on plasma levels". *Med.J.Aust.* 2, 121.
- UMEZAWA, H., OKAMI, Y., OSONO, T., OKA, Y., WATANABE, S., NUMEZA-KI, V., MORIYAMA, K., ISHIDA, H. and SUZAKI, K. (1967): "A new antibiotic, Josamycin. Isolation and physicochemical characteristics". *J.Antibiotics ser A.* 10, 1974, 180.
- UMEZAWA, H. and OSONO, T. (1964): "Processes for the production of Josamycin, a new antibiotic". Japan Patent n° 525, 633/Jap.Pat.Pub. 21759/66, published on Dec. 19 1966 filed on June 9.
- VALDEZ, S., MENENDEZ CABRAL, I. y VERGARA VELAZQUEZ, E. (1977): "Eficacia terapéutica de la Josamicina en las infecciones respiratorias en los adultos". *Hosp.Gral. Fernandez Quiroz Gutierrez, I.S.S.S. T.E., Mexico D.F. Investigación Médica Internacional Vol. 4 n°2* 119-123.

- VAN MARION, W.F., VAN DER MEER, J.W.M., KALFF, M.W. and SCHICHT, S.M. (1978): "Ototoxicity of erythromycin". *Lancet* 2, 214.
- VITEZI, A.L., HOWARD, P.H., DICK, W.P. (1974): *Gastroenterology* 66: 1137.
- WAISBREN, B.A. (1968): "Lincomycin in larger doses". *JAMA* 206, 2118.
- WELLS, R.F., COHEN, L.E. and McNEILL, C.J. (1974): "Clindamycin and pseudomembranous colitis". *Lancet* 1, 66.
- WENZEL, R.P., HENDLEY, J.O., DODD, W.K. and GWALTNEY, J.M.Jr. (1976): "Comparison of Josamycin and Erythromycin in the therapy of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia". *Antimicrob. Ag.Chemother.* 10, 899.
- WILKINS, T.D. and THIEL, M. (1973): *Antimicrob.Ag.Chemother.* 3: 136.
- WINEGRAD, S. and SHANES, A. (1962): "Calcium flux and contractility in guinea-pig atria". *J.Gen.Physiol.* 45, 371.
- WISSERMAN, C.L.Jr., WADDELL, A.D. and WALSH, W.T. (1974): "In vitro studies of the action of antibiotics on *Rickettsia prowazeki* by two methods of cell culture". *Infect. Dis.* 130, 564.
- WOOD, S.H. y WILSON, J.T. (1978): "Eritromicina y troleandomicina." *Terapçeutica Antimicrobiana*. Kagan B.M. Ed. Salvat 71-82.
- ZAMIRI, I. and McENTEGART, M.G. (1972): "The sensitivity of diphtheria bacilli to eight antibiotics". *J.Clin.Path.* 25, 716.
- ZIMMERMAN, H.J., KENDLER, J., LIBBER, S., LUKACS, L. (1974): *Biochem.Pharmacol.* 23: 2187.

